

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

**Estudio del perfil transcripcional de los receptores nucleares
LXR en un modelo celular de macrófago murino
inmortalizado**

**Transcriptional profiling of LXR nuclear receptors in an
immortalized murine macrophage cellular mode**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ana Ramón Vázquez

Directores

**Antonio Castrillo Viguera
Lisardo Boscá Gomar**

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE LOS
RECEPTORES NUCLEARES LXR EN UN MODELO CELULAR
DE MACRÓFAGO MURINO INMORTALIZADO.**

TRANSCRIPTIONAL PROFILING OF LXR NUCLEAR RECEPTORS IN AN
IMMORTALIZED MURINE MACROPHAGE CELLULAR MODEL

Ana Ramón Vázquez

DIRECTORES

Dr. Antonio Castrillo Viguera

Dr. Lisardo Boscá Gomar

MADRID, 2017

El trabajo recogido en la presente Tesis Doctoral ha sido realizado en el marco de los Proyectos de Investigación Fundamental No Orientada SAF2011-29244 y SAF2014-56819-R financiado por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad con la ayuda de una beca-contrato de formación de personal investigador BES-2012-058574.

El estudio se ha llevado a cabo en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” CSIC (Madrid) y en la Unidad Asociada de Biomedicina CSIC-Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC).

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis Antonio Castrillo y Lisardo Boscá, por haberme dado esta oportunidad para alcanzar mi sueño. Gracias Antonio por haberme elegido para formar parte de tu grupo y haber confiado en mí, esta Tesis no habría sido posible sin tu respaldo y tus sabios consejos. A Lisardo por haberme recibido siempre con amabilidad infinita, tu apoyo ha sido fundamental durante el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, los que están y los que ya se fueron: Merci, Irene, José, Vladi y Moisés. Gracias por echarme una mano siempre que lo he necesitado, por enseñarme tanto, sin vuestra ayuda no habría podido seguir adelante.

Por allí arriba en el Instituto Karolinska agradecer a Eckardt que me acogiese en su grupo y me diera la increíble oportunidad de hacer la estancia, con la que he aprendido tanto. A la gente con la que trabajé en su laboratorio: Saioa, Serena, Rocky, Ning y Huang, mil gracias por enseñarme tantas cosas y guiarme hasta el último día.

También quiero agradecer a Carlos Tabraue, Germán y Félix por sus debates y consejos, no sólo en el plano académico. A toda la gente del CULP: ¡chiquillos, ya sabéis quiénes sois! Por acogerme y escucharme, por los desayunos, los asaderos y las risas.

A mis amigos de la península, sois pocos pero vuestra amistad es muy valiosa: Espe, Dani, David, Andrea, Vicky...

A toda mi familia, por su apoyo incondicional. En especial a mi abuela y a mi madre: sabes que sin ti no sólo no tendría esta Tesis, sino que yo no sería nada.

A Luis, por estar siempre a mi lado y creer en mí, incluso cuando yo ya no creía más en mí misma. No puedo agradecerte suficiente tu apoyo.

¡Gracias a todos!

A mi madre

A Luis

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	7
ABREVIATURAS	13
INTRODUCCIÓN	21
1. El sistema inmunitario.....	21
1.1. Células del sistema inmunitario.....	22
1.2. Macrófagos.	23
1.2.1. Origen de los macrófagos.	23
1.2.2. Activación de los macrófagos.....	24
2. Superfamilia de receptores nucleares.....	26
2.1 Receptores X hepáticos: LXR.....	28
2.1.1. Funciones de los receptores nucleares LXR en el metabolismo lipídico.....	29
2.1.2. Funciones de los receptores nucleares LXR en macrófagos.	31
I. Aterosclerosis.	31
II. Metabolismo del colesterol.....	32
III. Rutas de señalización inflamatorias.	32
IV. Retirada de células apoptóticas.....	33
2.1.3. Funciones específicas de los receptores LXR α y LXR β	33
2.1.3.1. Funciones específicas de LXR α	33
2.1.3.2. Funciones específicas de LXR β	35
3. Modificaciones postraduccionales de las histonas.	36
3.1. Relevancia biológica de las modificaciones postraduccionales a nivel transcripcional.	38
3.2. Modelo tradicional de activación transcripcional dependiente de receptores nucleares.	39
3.3. Modelo de activación transcripcional en macrófagos en respuesta a inflamación.	40
4. Aplicación de nuevas tecnologías al estudio del genoma.	46
4.1. Inmunoprecipitación de cromatina seguida de secuenciación masiva (ChIP y ChIP-seq).	46
4.2. Secuenciación de última generación (NGS, <i>Next Generation Sequencing</i>).	47
4.3. Edición del genoma con la tecnología CRISPR.	50
4.3.1. Descripción del sistema CRISPR.	50
4.3.2. Mejoras aplicadas al sistema CRISPR.	53

OBJETIVOS	59
MATERIAL Y MÉTODOS	65
1. Animales de experimentación.....	65
2. Obtención de macrófagos primarios.....	65
2.1. Obtención de macrófagos peritoneales murinos mediante peritonitis estéril por inyección de tioglicolato.....	65
2.2. Obtención de macrófagos murinos derivados de médula ósea (BMDMs).....	66
3. Cultivo de células.....	66
3.1. Cultivos primarios. Cultivo de líneas celulares.	66
3.2. Tratamientos farmacológicos <i>in vitro</i>	67
4. Generación de líneas de macrófago inmortalizadas que expresan LXR α o LXR β	67
4.1. Inmortalización de macrófagos murinos obtenidos de médula ósea mediante el sistema retroviral J2.	67
4.2. Infección de las líneas de macrófago inmortalizadas con retrovirus portadores del plásmido con LXR α o LXR β – sistema celular Phoenix.	68
5. Citometría de flujo.....	69
6. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) y western blot.....	70
7. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) y secuenciación (ChIP-seq).....	71
7.1. Extracción, fijación y sonicado de la cromatina.....	71
7.2. Inmunoprecipitación y purificación del ADN.	72
7.3. Alineación de los datos de secuenciación obtenidos por ChIP-seq con el genoma murino... 75	
8. Extracción de ARN mensajero.	76
9. Análisis de perfil transcripcional mediante microarrays.....	76
10. Análisis de la expresión génica con RT-qPCR (reverse transcription quantitative polymerase chain reaction).....	77
10.1. Retrotranscripción de ARN a ADN complementario.....	77
10.2. Amplificación de ADN complementario por PCR cuantitativa (qPCR).	77
11. Análisis estadístico.....	78
12. Deleción de sitios genómicos de unión de LXR con la tecnología CRISPR.	79
12.1. Diseño del ARN guía (gRNA) e inserción en el plásmido pX461.....	80
12.2. Transfección de las células diana y selección de células positivas.....	82
13. Incubación de extractos de proteínas nucleares con oligonucleótidos biotinilados y western blot.	84

RESULTADOS	91
1. Generación de una línea immortalizada de macrófagos carente de la expresión de ambos receptores nucleares LXR α y LXR β	91
1.1. Caracterización fenotípica de la línea celular immortalizada de macrófagos LXR DKO.	91
1.2. Caracterización de la expresión y regulación de los genes diana de LXR en líneas immortalizadas de macrófago que expresan los receptores 3FLAG-LXR α y 3FLAG-LXR β	94
2. Análisis de la expresión génica de las líneas immortalizadas de macrófago con chip de ADN (microarrays).	98
2.1. Análisis de la expresión génica en las líneas immortalizadas de macrófago con herramientas bioinformáticas.	105
2.1.1. Cambios transcripcionales dependientes de ligando de LXR.	105
2.1.2. Análisis de expresión génica dependiente de LXR α o LXR β con respecto a la línea LXR DKO.	114
2.1.3. Análisis de expresión génica en las líneas 3FLAG-LXR β frente a 3FLAG-LXR α y viceversa.	117
3. Optimización de la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) para el análisis de las localizaciones genómicas de LXR.	123
3.1. Optimización de la sonicación de la cromatina.	123
3.2. Doble fijación de la cromatina con formaldehído y DSG.	124
3.3. Congelación de la cromatina previa a la sonicación.	126
3.4. Inmunoprecipitación de la proteína endógena RXR α en células fibroblásticas embrionarias de ratón (MEFs).	127
3.5. Aplicación de la técnica de inmunoprecipitación de cromatina a macrófagos primarios murinos.	129
3.6. Aplicación de la técnica de inmunoprecipitación de cromatina a las líneas immortalizadas de macrófago generadas: 3FLAG-LXR α y 3FLAG-LXR β . Rendimiento del anticuerpo específico anti-FLAG.	132
3.7. Comprobación de la unión de LXR a los genes diana en condiciones de tratamiento con el agonista y antagonista sintéticos de LXR: GW3965 y GW233.	134
4. Estudio del patrón de unión en el genoma (cistroma) de cada receptor nuclear LXR en las líneas immortalizadas de macrófago 3FLAG-LXR α y 3FLAG-LXR β mediante ChIP.	136
5. Análisis de la acetilación en la lisina 27 de la histona H3, una marca genética asociada con la expresión génica en respuesta a la modulación de la actividad de LXR.	141
6. Verificación de la expresión de los genes <i>Orm-3</i> , <i>Il-1α</i> y <i>Lbp</i> en macrófagos primarios.	144

7.	Aplicación de la tecnología CRISPR para la delección de sitios de unión de LXR en genes diana.....	150
7.1.	Delección de la localización genómica de LXR en la zona reguladora de la expresión del gen <i>Myliip</i>	150
7.2.	Delección del sitio de unión de LXR en el <i>enhancer</i> del gen <i>Aim</i>	157
8.	Identificación de la secuencia de unión de LXR α en el <i>enhancer</i> del gen <i>Aim</i> mediante unión <i>in vitro</i> a oligonucleótidos biotinilados.	159
TABLAS	161
DISCUSIÓN	175
1.	Modelo celular de macrófago inmortalizado.	175
2.	Análisis del perfil transcripcional de LXR α y LXR β mediante microarrays.	176
3.	Análisis bioinformático de los resultados obtenidos por microarrays.	177
3.1.	Análisis de la actividad transcripcional de LXR α y LXR β en condiciones activación e inhibición farmacológica.....	177
	A. Proteína de unión a lipopolisacárido (LBP).	179
	B. Familia de proteínas orosomucoide (ORM).	180
	C. Interleuquina-1 α (Il-1 α).	181
3.2.	Análisis de la actividad transcripcional en referencia a la línea celular LXR DKO.	183
3.3.	Análisis de la actividad transcripcional preferente en la línea 3FLAG-LXR α en referencia a 3FLAG-LXR β y viceversa.	186
4.	Optimización de la técnica de inmunoprecipitación de cromatina dependiente de LXR en macrófagos.	187
5.	Delección de secuencias de unión de LXR en el genoma de macrófagos con CRISPR.	187
CONCLUSIONES	193
CONCLUSIONS	199
BIBLIOGRAFÍA	205

RESUMEN

RESUMEN

Las proteínas LXR α y LXR β son factores de transcripción que pertenecen a la familia de los receptores nucleares. Son activados por formas modificadas de colesterol (oxisteroles) y controlan la transcripción de genes que juegan un papel crucial en el control del metabolismo lipídico. También intervienen en diversos aspectos de la biología del macrófago, como son la respuesta inflamatoria, la supervivencia ante agentes infecciosos y la fagocitosis de restos celulares. Comparten un alto porcentaje de homología de secuencia y se conocen algunas funciones desempeñadas indistintamente por LXR α y LXR β , pero el papel individual de cada uno de los receptores LXR no ha sido caracterizado en profundidad hasta la fecha.

Uno de los objetivos que se ha abordado en el presente trabajo de Tesis Doctoral ha sido identificar las funciones biológicas comunes y diferenciales en las que intervienen los receptores nucleares LXR en macrófagos murinos. Hemos diseñado un modelo celular de expresión, con el que hemos individualizado las actividades transcripcionales de los receptores LXR α y LXR β , así como un modelo de control, carente totalmente de expresión de receptores LXR. Se realizó un estudio de expresión génica derivada de la actividad de los receptores LXR α y LXR β , en presencia de un agonista y antagonista sintéticos, mediante la técnica de microarrays. Adicionalmente, se empleó esta técnica para realizar un análisis comparativo de la expresión génica registrada en las líneas celulares de macrófago generadas. Con la aplicación de herramientas bioinformáticas se ha analizado la composición en número e identidad de los genes que se expresaron con una magnitud significativa, así como de las funciones biológicas en las que están implicados. Estas herramientas también nos han posibilitado dilucidar los posibles mecanismos transcripcionales por los que las proteínas LXR ejercerían un control sobre los genes a los que afectan, como pueden ser la inducción o represión transcripcionales.

Hemos encontrado que la actividad transcripcional dependiente de ligandos sintéticos es similar entre los dos receptores nucleares LXR α y LXR β y que, a pesar de su elevado grado de homología de secuencia, comparten el control de la expresión génica de una fracción proporcionalmente pequeña de genes. La expresión estable de LXR β en el macrófago participa en el control transcripcional preferencial de un grupo de genes relevantes por su implicación en diferentes aspectos de la respuesta inflamatoria. Por otro lado, el receptor nuclear LXR α presenta una actividad transcripcional dual: es responsable tanto del aumento como de la represión de grupos numerosos de genes que desempeñan funciones muy variadas.

Otro objetivo consistió en profundizar en el conocimiento de la organización del genoma del macrófago murino y la interacción de los receptores LXR con las secuencias reguladoras conocidas y de potenciales nuevos genes diana. Se optimizó la técnica de inmunoprecipitación de cromatina seguida de secuenciación masiva (ChIP-seq) para su aplicación en el genoma de macrófagos murinos, lográndose la identificación de los sitios de unión de las proteínas LXR α y LXR β (cistroma) a nivel de genoma completo. También se han estudiado con esta técnica los cambios genómicos en las marcas de acetilación en la lisina 27 de la histona H3, asociada con una transcripción activa de genes, en presencia de un agonista y antagonista sintéticos de LXR.

Resumen

Finalmente, se examinó la funcionalidad de regiones reguladoras de la transcripción de genes diana conocidos de LXR con técnicas avanzadas de edición génica (CRISPR). Se logró la alteración de la secuencia consenso de unión de las proteínas LXR en la región reguladora de la transcripción del gen diana *Myliip*. Como consecuencia, los efectos de la proteína correspondiente en respuesta a la activación de los receptores LXR con el agonista sintético se vieron revertidos.

Tanto el modelo celular que hemos generado como las técnicas de nueva generación aplicadas al estudio del genoma: inmunoprecipitación de cromatina seguida de secuenciación masiva y edición genómica mediante CRISPR, han demostrado su gran potencial como herramientas experimentales para el estudio de la actividad de los receptores nucleares LXR y su interacción con el genoma de macrófago murino.

ABSTRACT

ABSTRACT

The LXR proteins, LXR α and LXR β , are transcription factors that belong to the nuclear receptor superfamily. They are activated by modified forms of cholesterol (oxysterols) and control the transcription of genes that play a crucial role in the regulation of lipid metabolism. They also mediate several aspects of macrophage biology like the inflammatory response, cell survival in response to infection and phagocytosis of cell debris. These proteins share a high sequence homology and even some functions are known to be performed equally by LXR α and LXR β , but the individual biological role of each LXR nuclear receptor has not been characterized to date.

One of the objectives that we have pursued in the present thesis project has been to identify both the common and differential biological functions in which the LXR nuclear receptors take part in mouse macrophages. We have developed a cellular model of expression to isolate transcriptional activities of LXR α and LXR β , in addition to a control model that does not express LXR proteins. We performed a gene expression analysis of LXR α and LXR β , in the presence of a synthetic agonist and antagonist, using microarray technology. Additionally, we made use of this technique to carry out a comparative analysis of gene expression among the different macrophage cell lines. Using bioinformatics tools we analysed the number and identities of the gene transcripts that were expressed significantly higher and the biological pathways in which they were involved. These bioinformatics tools have also been useful in clarifying possible mechanisms underlying LXR transcriptional gene control, like expression induction or repression.

Here we show that ligand-dependent transcriptional activity is similar for both LXR α and LXR β nuclear receptors and that, despite their high sequence homology, they share the control of a proportionally reduced fraction of genes. Stable expression of LXR β in macrophages is linked to preferential transcription of a relevant group of genes for their implication in different aspects of inflammatory response. On the other hand, LXR α displays a dual transcriptional activity: it is responsible for both transcriptional expression and repression of large group of genes involved in several different biological activities.

Another goal was to take a deeper insight into the mouse genome organization and the interactions between LXR nuclear receptors and the genomic regulatory sequences influencing known and potentially new target genes. We optimized the chromatin immunoprecipitation technique combined with next-generation sequencing (ChIP-seq) for the mouse macrophage genome, achieving the identification of the DNA binding sites for LXR α and LXR β proteins genome-wide (cistrome). Genomic changes in the acetylation mark on lysine 27, histone H3, upon LXR agonist and antagonist exposure, associated with active gene transcription, has also been examined with this technique.

Abstract

Finally, we dissected the functionality of genomic regulatory sequences affecting transcription of known target genes using advanced genomic editing tools (CRISPR). We managed to modify the LXR canonical binding site included in the regulatory region of the *Mylip* target gene. As a consequence, the effects derived from the protein in response to activation with the synthetic agonist were abrogated.

The macrophage cell line that we generated as a cellular model, as well as the new generation tools designed to study the genome: immunoprecipitation technique combined with next-generation sequencing (ChIP-seq) and genome editing with CRISPR, have demonstrated to exhibit a great potential as experimental tools to study the activity of the LXR nuclear receptors and their interaction with the mouse macrophage genome.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

3FLXR α / β : LXR unido a tres repeticiones del polipéptido FLAG

ABCA1: Transportador de membrana dependiente de unión a ATP, miembro A1 (*ATP-Binding Cassette Transporter A1*)

ABCG1: Transportador de membrana dependiente de unión a ATP, miembro G1 (*ATP-Binding Cassette Transporter G1*)

ACC (Acaca): Acetil-CoA carboxilasa (*acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha*)

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

AF-1 / AF-2: Dominio de función activadora-1/-2 (*Activation Function -1/-2*)

AIM: Factor de inhibición de apoptosis secretado por macrófagos (*Apoptosis Inhibitory factor secreted in Macrophages*)

AP-1: Proteína activadora 1 (*Activator Protein-1*)

APC: Aloficocianina (*Allophycocyanin*)

API6: Inhibidor de la Apoptosis en Macrófagos 6 (*Apoptosis Inhibitor 6*)

APO: Apolipoproteína

APOE: Apolipoproteína E

ARL7 (ARL4C): Factor de ADP ribosilación 7 (*ADP-ribosylation factor-like 7*)

ARN: Ácido ribonucleico

ARNg: Ácido ribonucleico guía

BMDMs: Macrófagos diferenciados de médula ósea (*Bone Marrow-Derived Macrophages*)

BSA: Albúmina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*)

CD: Grupo de diferenciación (*Cluster of Differentiation*)

CDs: Células dendríticas

CDP: Precursor común de células dendríticas (*Common Dendritic cell Precursor*)

CETP: Proteína de transferencia de ésteres de colesterol (*Cholesteryl ester transfer protein*)

ChIP: Inmunoprecipitación de cromatina (*Chromatin Immunoprecipitation*)

ChIP-seq: Inmunoprecipitación de cromatina seguido de secuenciación masiva (*Chromatin Immunoprecipitation-sequencing*)

CLP: Progenitor común linfoide (*Common Lymphoid Progenitor*)

CMP: Progenitor común mieloide (*Common Myeloid Progenitor*)

CORO2A: Coronina A2 (*Coronin 2A*)

COX-2: Ciclooxygenasa 2

CRISPR: Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (*Clustered Regularly-Interspaced Short Palindromic Repeats*)

crRNA: ARN de CRISPR (*CRISPR RNA*)

CSF1: Factor estimulador de colonias 1 (sinónimo de M-CSF) (*Colony Stimulating Factor 1*)

Cy5.5 / Cy7: Cianina 5.5 / Cianina 7 (*Cyanine 5.5 / Cyanine 7*)

CYP7A1: Citocromo P450, familia 7, subfamilia A, polipéptido 1 (*Cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1*)

DAMPs: Señales moleculares asociadas a daño tisular (*Damage-Associated Molecular Patterns*)

DBD: Dominio de unión a ADN (*DNA Binding Domain*)

DEPC: Dietil pirocarbonato

DMEM: Medio de cultivo de Dulbecco modificado de Eagle (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

DMSO: Dimetilsulfóxido

DR: Repetición directa (*Direct Repeat*)

DSG: Di-N-succinimidil glutarato

FASN: Sintasa de ácidos grasos (*Fatty Acid Synthase*)

FBS: Suero Fetal Bovino (*Fetal Bovine Serum*)

FITC: Isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein Isothiocyanate*)

Abreviaturas

FLT3L: Ligando de la tirosina quinasa 3 similar a FMS (*FMS-Like Tyrosine kinase 3 Ligand*)
FXR: Receptores X de farnesoide (*Farnesoid X Receptors*)
GM-CSF: Factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*)
GW233: GSK1440233A (Antagonista de LXR)
GW3965: GW3965 (Agonista de LXR)
HAT: Histona acetiltransferasa (*Histone acetyltransferase*)
HDAC: Histona deacetilasa (*Histone deacetylase*)
HDL: Lipoproteína de alta densidad (*High-density lipoprotein*)
HDR: Recombinación homóloga del ADN (*Homology-Directed Repair*)
HSC: Células madre hematopoyéticas (*Haematopoietic Stem Cells*)
IDOL (MYLIP): Degradador inducible del receptor de lipoproteínas de baja densidad (*Inducible Degradator of Low-density lipoprotein Receptor*)
IFN γ : Interferón gamma
IL-1 α : Interleuquina-1 α
iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible (*Inducible Nitric Oxide Synthase*)
LBD: Dominio de unión a ligando (*Ligand Binding Domain*)
LBP: Proteína de unión de LPS (*LPS-Binding Protein*)
LDL: Lipoproteína de baja densidad (*Low-density lipoprotein*)
LDLR: Receptor de lipoproteínas de baja densidad (*Low-density lipoprotein Receptor*)
LPL: Lipoproteína lipasa (*Lipoprotein lipase*)
LPS: Lipopolisacárido bacteriano
LXR DKO: Mutante carente de expresión de los dos receptores LXR (*LXR Double Knockout*)
LXR: Receptor X hepático (*Liver X Receptor*)
LXRE: Elemento de respuesta a LXR (*LXR Response Element*)
LY6C: Complejo antigénico de linfocitos 6 (*Lymphocyte Antigen 6 Complex*)
MARCO: Receptor de macrófagos con estructura colagenosa (*Macrophage Receptor with Collagenous structure*)
MDP: Progenitor de Macrófagos y Células Dendríticas (*Macrophage/Dendritic cell Progenitor cells*)
MEFs: Fibroblastos embrionarios de ratón (*Mouse Embryonic Fibroblasts*)
MMP: Metaloproteínasa (*Metalloproteinase*)
MYD88: Factor de diferenciación mieloide 88 (*Myeloid Differentiation primary response gene 88*)
NCoR: Proteína correpresora de receptores nucleares (*Nuclear Receptor Corepressor*)
NF κ B: Factor nuclear kappa de células B, subunidad 1 (*Nuclear Factor Kappa B subunit 1*)
NHEJ: Recombinación no homóloga de ADN (*Non-Homologous End Joining*)
NK: Célula asesina natural (*Natural Killer*)
NO: Óxido nítrico (*Nitric Oxide*)
ORM: Proteína orosomucoide o alfa-1-glicoproteína ácida (*Orosomucoid*)
PAMPs: Receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*)
PBS: Tampón fosfato salino (*Phosphate-Buffered Saline*)
PE: Ficoeritrina (*Phycoerythrin*)
PerCP: Complejo de proteína peridinina-clorofila (*Peridinin Chlorophyll Protein Complex*)
PPAR: Receptor activador de la proliferación de peroxisomas (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor*)
PRRs: Receptores de reconocimiento de patrones moleculares (*Pattern-Recognition Receptors*)
ROS: Especies reactivas del oxígeno (*Reactive Oxygen Species*)
RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción reversa (*Reverse Transcription-Quantitative Polymerase Chain Reaction*)
RXR: Receptor de ácido retinoide (*Retinoid Acid Receptor*)
SIGN-R1 (DC-SIGN): Molécula de adhesión intercelular 3 no asociada a integrina, específica de células dendríticas (*Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin*)

Abreviaturas

SCD1 / SCD2: Estearoil-Coenzima A desaturasa 1 / 2 (*Stearoyl-CoA desaturase 1 / 2*)
SLC: Transportador de solutos (*Solute Carrier*)
SMRT: Mediador de Silenciamiento para Receptores Retinoides y Tiroideos (*Silencing Mediator of Retinoic Acid and Thyroid Hormone Receptor*)
SRC: Coactivador de Receptores Esteroides (*Steroid Receptor Coactivator*)
SREBF1: Factor de unión al elemento de respuesta a esteroides 1 (*Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1*)
SUMO: Modificador pequeño similar a ubiquitina (*Small Ubiquitin-like Modifier*)
TBL1: Transducina- β tipo 1 (*Transducin Beta-Like 1*)
TBLR1: Receptor 1 de transducina- β tipo 1 (*Transducin Beta-Like 1 Receptor 1*)
TGF β : Factor de crecimiento transformante β (*Transforming Growth Factor β*)
TIM4: Molécula 4 conteniendo dominios de inmunoglobulina de célula T y mucina (*T cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule-4*)
TLR: Receptor de tipo toll (*Toll-Like Receptor*)
tracrRNA: ARNcr transactivador (*Trans-activating crRNA*)
TRAF6: Factor 6 asociado al receptor de necrosis tumoral (*Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 6*)
TSS: Sitio de inicio de la transcripción (*Transcription Start Site*)
VDR: Receptor de vitamina D (*Vitamin D Receptor*)
VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad (*Very Low Density Lipoprotein*)
WAT: Tejido adiposo blanco (*White Adipose Tissue*)
ZBTB33 (Kaiso): Proteína 33 con dedos de zinc y dominio BTB (*Zinc finger and BTB domain containing 33*)

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. El sistema inmunitario.

El sistema inmunitario es un conjunto de órganos, tejidos, células y proteínas que se coordinan en la defensa del organismo frente a agentes potencialmente dañinos para mantener la integridad biológica del individuo. Para poder desempeñar su acción debe ser capaz de distinguir entre lo propio y lo extraño (Medzhitov y Janeway, 2002) de manera que se desencadene una respuesta para eliminar aquello potencialmente dañino, pero sin afectar a células y estructuras propias.

Los organismos poseen una primera línea de defensa constituida por barreras naturales y mecanismos que impiden la entrada de patógenos, como son la piel, el pH y la microbiota entre otras. Si estas estructuras fallan o no son suficientes para evitar la entrada se pone en funcionamiento el sistema inmunitario que consta de dos tipos de respuesta: una innata y otra adaptativa (Fig. 1).

La respuesta innata está compuesta por células: macrófagos, células dendríticas, neutrófilos y células NK (*natural killer*) y moléculas como las citoquinas y el sistema del complemento. Sus principales características son la rapidez de actuación y la inespecificidad de la respuesta. Sin embargo, existe un reconocimiento muy básico de lo extraño por parte de las células de la inmunidad innata a través de receptores de patrones moleculares asociados a patógenos (PRRs, *Pattern-Recognition Receptors*), los cuales reconocen estructuras moleculares presente a patógenos (PAMP, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) y no en el huésped, así como señales asociadas a daño tisular (DAMP, *Damage-Associated Molecular Patterns*) (Janeway et al., 2001). El reconocimiento de estas estructuras especiales conduce a una respuesta rápida y carente de especificidad que implica de forma característica inflamación, activación y atracción de otras células al foco infeccioso y neutralización de los agentes nocivos mediante diversos mecanismos. Esta respuesta innata inicial es también importante para la organización de una respuesta más específica o adaptativa.

La respuesta adaptativa, a diferencia de la innata, está dirigida contra elementos específicos de cada patógeno, llamados antígenos, que constituyen la mínima parte de un elemento extraño capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria y se reconocen con receptores altamente específicos para ellos. Se caracteriza por ser una respuesta más lenta, pero tiene la ventaja de ser sostenida en el tiempo y de generar una memoria inmunológica que permite reaccionar más rápida y eficazmente en una segunda exposición frente a un mismo antígeno. Tiene a su vez dos componentes fundamentales: uno celular y otro humoral. El primero comprende los linfocitos T y B y el segundo a los anticuerpos, producidos por las células B maduras (Fig. 1).

A pesar de que en cada tipo de respuesta los componentes se encuentran altamente especializados en sus funciones, existe una alta comunicación e interacción entre los elementos, que permite una modulación recíproca y un ajuste de la respuesta inmunitaria a cada situación.

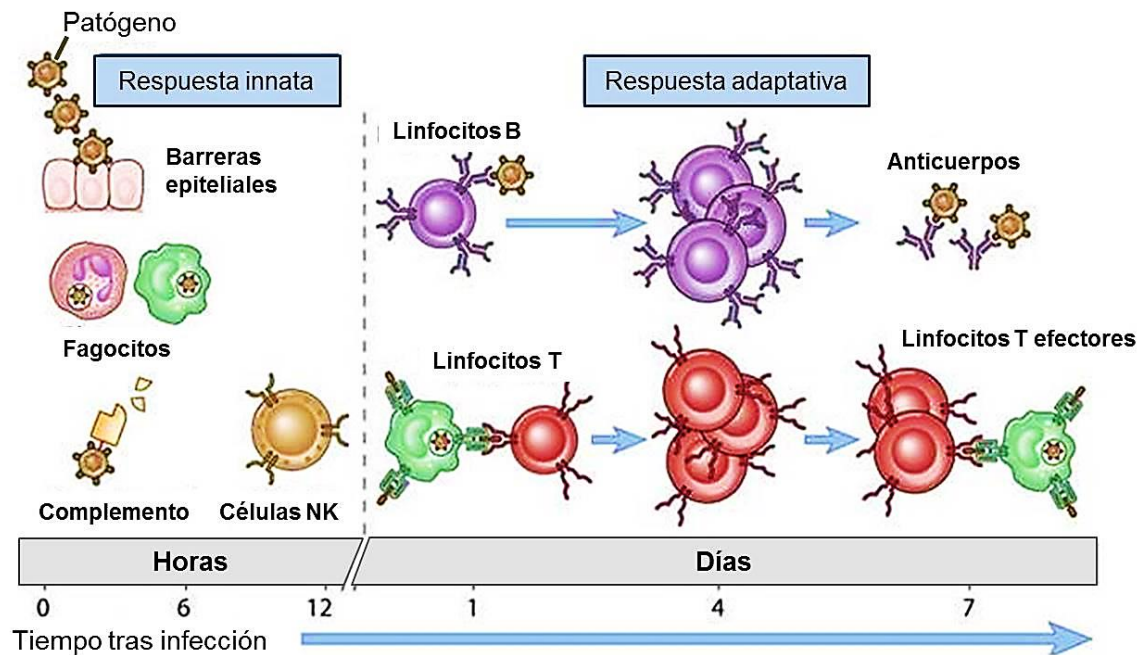


Figura 1. Esquema de los componentes que integran cada tipo de respuesta inmunitaria. La respuesta inmunitaria innata se caracteriza por la rapidez e inespecificidad de la reacción que desencadena, actuando a través de un reconocimiento de estructuras extrañas. Su actuación se produce inmediatamente y durante las primeras horas tras la entrada del patógeno en el organismo, con el fin de bloquear su diseminación. Si la presencia del patógeno persiste, se activa la respuesta inmunitaria adaptativa, compuesta por células que durante los siguientes días desarrollarán receptores altamente específicos para el reconocimiento y neutralización del patógeno.

1.1. Células del sistema inmunitario.

Todas las células del sistema inmunitario provienen de células madre hematopoyéticas (HSC, *Haematopoietic Stem Cells*). La hematopoyesis tiene lugar inicialmente en el saco vitelino de mamíferos durante las primeras semanas del desarrollo embrionario, lo que se conoce como hematopoyesis primitiva. Más adelante, el hígado y bazo fetal relevan al saco vitelino en esta función. Antes del nacimiento adquiere prominencia la función hematopoyética de la médula ósea, que será el principal y único órgano hematopoyético en humanos, mientras que en ratones el bazo aún conserva capacidad hematopoyética en adultos (Morita et al., 2011).

De acuerdo con la teoría clásica de diferenciación hematopoyética, las HSCs tienen capacidad de renovarse y dar lugar a células más diferenciadas denominadas células progenitoras mieloides (CMP, *Common Myeloid Progenitor*) y linfoides (CLP, *Common Lymphoid Progenitor*). Las CMP darán lugar a granulocitos, monocitos, macrófagos, células dendríticas y mastocitos mientras que las CLP originarán los linfocitos T y B y células NK.

1.2. Macrófagos.

Los macrófagos fueron descritos por primera vez a finales del siglo XIX por el microbiólogo ruso Elie Metchnikoff como células capaces de engullir microorganismos y otros elementos extraños. Son células fagocíticas profesionales claves en la respuesta inmunitaria no sólo porque son capaces de destruir patógenos, sino porque constituyen una parte importante de la comunicación entre la inmunidad innata y adaptativa, entre otras funciones. Asimismo, tienen un papel crucial en la regulación del metabolismo y la homeostasis celular.

1.2.1. Origen de los macrófagos.

Tradicionalmente se habían considerado células diferenciadas sin capacidad proliferativa y cuyo origen está exclusivamente en los monocitos procedentes de células madre hematopoyéticas de la médula ósea, que viajan por el torrente circulatorio hasta que se extravasan a los tejidos y se diferencian a macrófagos. Sin embargo, hoy en día conocemos que este concepto clásico de la diferenciación de macrófagos es válido para un conjunto de tejidos como el intestino, la dermis, el corazón, el páncreas y el peritoneo (revisado en Ginhoux y Jung, 2014). Los macrófagos residentes en otros tejidos tienen un origen embrionario capaz de autorenovarse: la microglía por ejemplo, es el prototipo de macrófago tisular que se origina de progenitores derivados del saco vitelino, los cuales constituyeron la primera oleada de precursores que colonizaron los órganos durante el desarrollo embrionario temprano. Los macrófagos de pulmón, riñón e hígado se originan de monocitos fetales hepáticos, que constituyen la segunda oleada de precursores, llegando a desplazar a los macrófagos derivados del saco vitelino en casi la totalidad de estos tejidos (Fig. 2). Las células de Langerhans son una excepción, ya que tienen un origen dual: provienen tanto del saco vitelino como del hígado fetal. Ambos tipos de progenitores embrionarios se diferencian en su dependencia de los factores de transcripción Myb y PU.1 para su desarrollo. Mientras que los precursores derivados del saco vitelino son Myb independientes, pero PU.1 dependientes, los derivados del hígado fetal son dependientes de ambos (Wynn et al., 2013). Además, ante la lesión de un tejido y dependiendo de la gravedad, puede recuperarse el número de macrófagos a partir de la proliferación local de la población residente o pueden reclutarse del torrente circulatorio monocitos que se diferenciarán, si la lesión es severa.

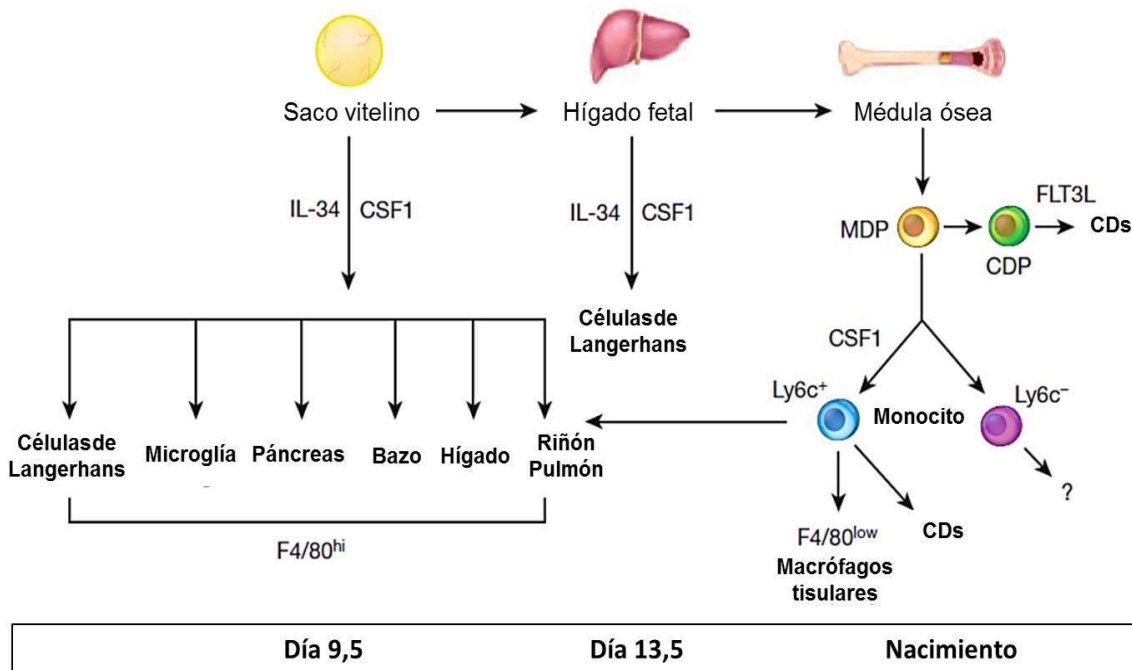


Figura 2. Esquema del origen de los macrófagos tisulares. Existen tres tejidos de los que se originan los macrófagos que colonizarán los tejidos del organismo. El saco vitelino es el primero que actuará durante el desarrollo embrionario originando los progenitores $F4/80^{hi}$, que responden a los ligandos IL-34 y CSF1 a través del receptor CSFR1 y darán lugar a los macrófagos “primitivos” en los tejidos. El hígado fetal produce la segunda oleada de progenitores que desplazarán en los tejidos a la mayoría de los macrófagos originados en el saco vitelino. La función de hematopoyesis será asumida por la médula ósea en el momento del nacimiento, que producirá monocitos de dos tipos: $Ly6c^{+}$ y $Ly6c^{-}$ siendo los primeros precursores de los macrófagos tisulares $F4/80^{low}$ que se sumarán a los preexistentes en los órganos adultos. Adaptado de Wynn et al., 2013.

1.2.2. Activación de los macrófagos.

La activación o polarización del macrófago consiste en que ante el encuentro con patógenos, señales de daño tisular u otros estímulos externos se producen una serie de cambios en el fenotipo del macrófago que le preparan para reaccionar. Este estado de activación va a depender en gran medida de la exposición previa que haya sufrido a otras señales, factores de diferenciación, citoquinas o microambiente tisular. Como consecuencia, existen multitud de estados de activación que puede adoptar el macrófago, pero tradicionalmente y por simplicidad se clasifican en dos grandes grupos, que representan dos estados de activación extremos observados en su plenitud máxima en macrófagos en cultivo: activación clásica (también denominados proinflamatorios o M1) y activación alternativa (antiinflamatorios, reparadores o M2) (Sica y Mantovani, 2012) (Fig. 3).

- Los macrófagos proinflamatorios polarizados de forma clásica: secretan TNF- α , IL-12, IL-6 e IL-23, así como especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y exhiben una alta capacidad para la presentación de antígenos y neutralización de patógenos. La exposición durante su diferenciación a citoquinas como GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos) o IFN γ también determinan un fenotipo proinflamatorio. Tienen un control sobre la diferenciación de los linfocitos T hacia células T *helper* (Th) de tipo 1. Los macrófagos asociados al sinovio de las articulaciones en la enfermedad de artritis reumatoide es un ejemplo de este tipo de macrófago M1.
- Los macrófagos polarizados de forma alternativa: la exposición a IL-10, M-CSF (o CSF1, factor estimulante de colonias de macrófagos), IL-4, IL-13 o glucocorticoides condicionan la polarización hacia este tipo de macrófagos. Una vez diferenciados ellos mismos producen también IL-10, que influye sobre los linfocitos T para que su diferenciación se oriente hacia células T *helper* de tipo 2. Los macrófagos de la lámina propia intestinal que interaccionan con la microbiota son un ejemplo de macrófago que presenta una activación predominantemente alternativa.

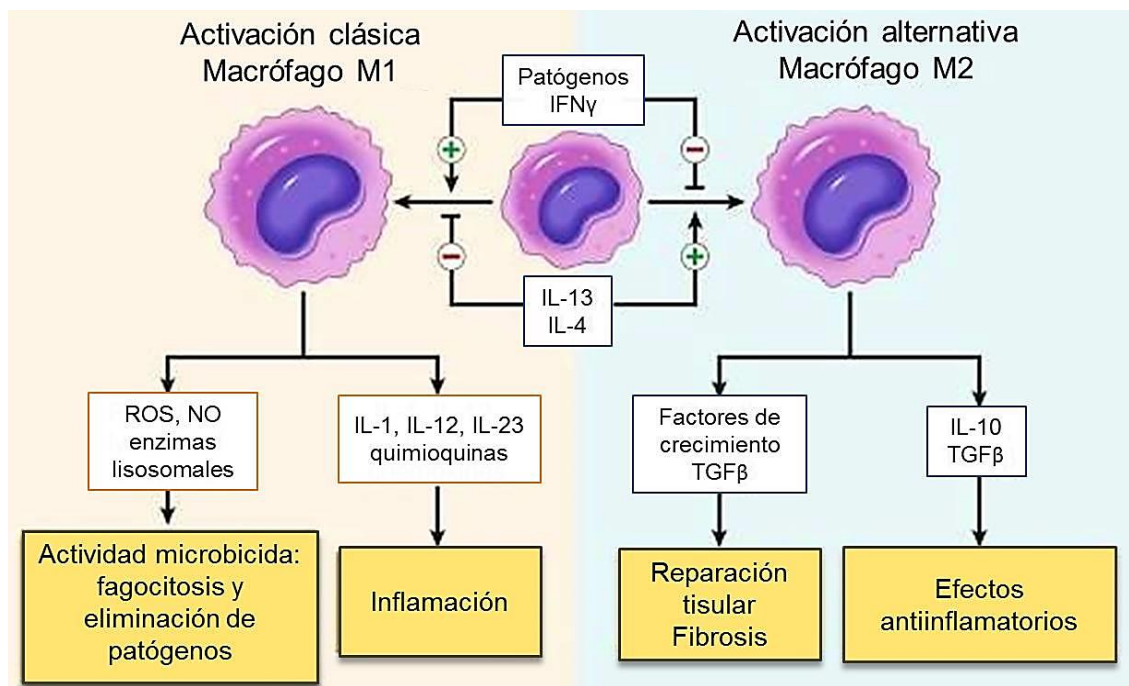


Figura 3. Esquema de los tipos de activación de los macrófagos. La exposición de los macrófagos a diferentes estímulos derivados de patógenos, linfocitos o daño tisular condicionan su polarización hacia un tipo de activación que puede ser “clásica” o “alternativa”. Los macrófagos polarizados de forma clásica funcionalmente tienen alta capacidad fagocítica, citotóxica y de producción de citoquinas proinflamatorias. Los macrófagos polarizados de forma alternativa, por el contrario, producen citoquinas antiinflamatorias y contribuyen a la resolución de la respuesta inflamatoria y la reparación de los tejidos.

2. Superfamilia de receptores nucleares.

La superfamilia de los receptores nucleares incluye un grupo diverso de factores de transcripción (hasta 49 en humanos) que integran las señales homeostáticas de prácticamente todos los procesos biológicos. Su estructura proteica presenta una organización altamente conservada en 6 dominios (A-F) (Fig. 4): una región N-terminal con un motivo (A/B) activador ligando-independiente (AF-1, *Activation Function 1*), una región de unión al ADN (C) con dos dominios “dedos de zinc” (BDB, *DNA Binding Domain*), una región intermedia (D) de longitud variable que actúa de bisagra y separa el dominio de unión a ADN de la región (E) de unión a ligando (LBD, *Ligand Binding Domain*) en el extremo C-terminal. Este dominio incluye una región con un motivo (F) activador de transcripción ligando-dependiente (AF-2, *Activation Function 2*) (Olefsky, 2001) (Glass y Ogawa, 2006). Es a través de este dominio AF2 que el receptor LXR interacciona con coactivadores y correpresores.

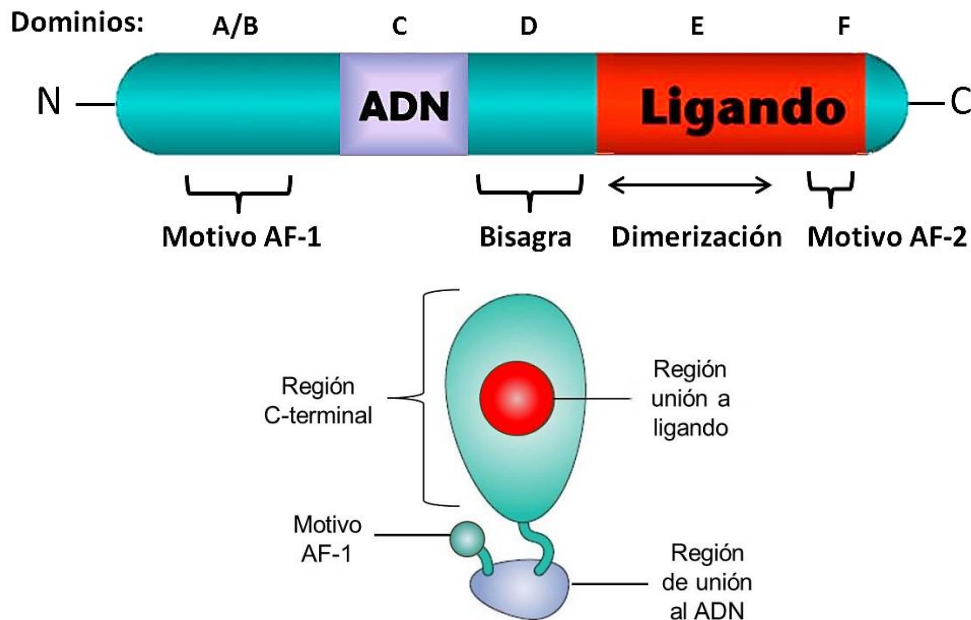


Figura 4. Estructura general de los receptores nucleares. Los integrantes de la superfamilia de los receptores nucleares poseen una estructura proteica altamente conservada dividida en 6 dominios (A-F). Región N-terminal activadora ligando-independiente (AF-1, *Activation Function 1*) con motivo (A/B), región de unión al ADN (BDB, *DNA Binding Domain*) con dos dominios “dedos de zinc” (C), una región intermedia (D) de longitud variable que actúa de bisagra y región (E) de unión a ligando (LBD, *Ligand Binding Domain*) en el extremo C-terminal, que posibilita la dimerización de los receptores nucleares. En este dominio se encuentra una región con un motivo (F) activador de transcripción ligando-dependiente (AF-2, *Activation Function 2*). Se muestra la disposición de cada una de las regiones del receptor LXR en la proteína plegada.

Los receptores nucleares se pueden dividir en 3 subfamilias atendiendo a la naturaleza de los ligandos que unen: los receptores de hormonas esteroideas, que actúan como homodímeros y se translocan del citoplasma al núcleo; los receptores “huérfanos”, cuyos ligandos no habían sido identificados en el momento de su descripción y los receptores “huérfanos adoptados” que fueron originalmente receptores huérfanos la descubrirse, pero ahora sus ligandos han sido identificados con la ayuda de métodos químicos, estructurales o genómicos (Fig. 5). Este tipo de receptores son constitutivamente nucleares y se unen al ADN como heterodímeros obligados con RXR y entre ellos se encuentran los receptores X hepáticos (LXR) y receptores X de farnesoide (FXR). Los heterodímeros formados con el receptor X de retinoide (RXR) pueden ser activados de tres formas: la activación del complejo se realiza exclusivamente a través de los ligandos de la pareja de RXR, por lo que RXR funciona como un “acompañante silencioso”, es el caso de RXR-VDR (receptor de vitamina D). La activación puede darse a través de los ligandos de ambos receptores, lo que implica que podrían actuar de forma sinérgica si ambos ligandos están presentes al mismo tiempo, es el caso de RXR-LXR. Finalmente en el caso de los heterodímeros condicionales el ligando de RXR tiene un efecto activador únicamente si el ligando del receptor al que se une está también presente y en combinación es capaz de actuar sinérgicamente.

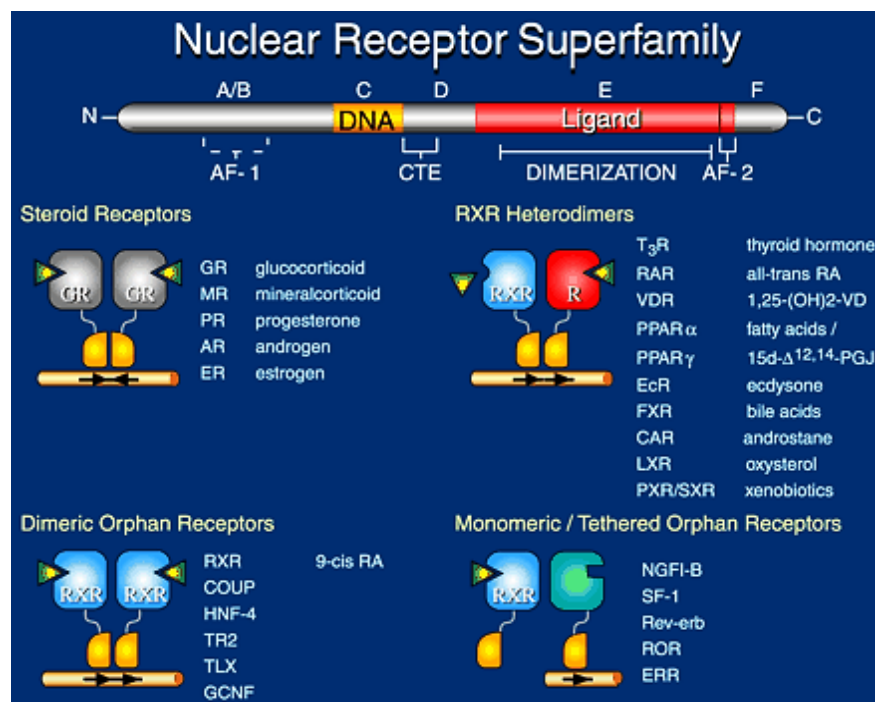


Figura 5. Miembros de la superfamilia de receptores nucleares clasificados según su asociación en dímeros o monómeros. Tras su descubrimiento, los receptores nucleares se han clasificado según la naturaleza del ligando que unen: receptores de hormonas esteroideas, los receptores “huérfanos” (sin ligando conocido) y los receptores “huérfanos adoptados”, cuyo ligando se descubrió después de la inclusión en este sistema de clasificación. A su vez los receptores “huérfanos” pueden actuar como dímeros con el receptor X retinoide (RXR) o como monómeros. Adaptado de Olefsky, 2001.

Los receptores nucleares actúan mediante la unión a secuencias específicas de ADN llamadas elementos de respuesta a hormonas (HRE, *Hormone Response Elements*) en las regiones reguladoras de sus genes diana. Para los miembros no esteroideos de esta superfamilia, el elemento de respuesta a hormonas consiste en una repetición de un doble hexámero con la secuencia consenso NGKKYAnnnnNGKKYA (donde n es cualquier nucleótido, K es guanina o timina e Y es citosina o timina), separadas las repeticiones por nucleótidos al azar que según el número determinará la unión de uno u otro receptor. La estructura del elemento respuesta se resume por tanto como DR (*direct repeat*) y un número que indica los nucleótidos de separación, en el caso de LXR la estructura es DR4 (Mangelsdorf y Evans, 1995). Las secuencias de unión DR son asimétricas y se sabe que en los casos en los que se forman heterodímeros con RXR éste ocupará la secuencia situada en el extremo 5' (Kurokawa et al., 1993).

La regulación de la transcripción dependiente de los receptores nucleares se puede resumir a través de tres mecanismos principales: activación directa de la transcripción del gen (transactivación dependiente de ligando), represión independiente de ligando y transrepresión. Esta última según la cual los heterodímeros pueden inhibir la actividad transcripcional de otros factores de transcripción sin necesidad de unión al ADN, mediante una unión proteína-proteína (Glass y Saijo, 2010). Este proceso se ha descrito para receptores LXR (Ghisletti et al., 2007) y PPAR γ (Pascual et al., 2005), siendo necesaria para llevarse a cabo la unión de los receptores nucleares a su ligando y la modificación postraduccional de LXR de su dominio de unión a ligando por SUMOilación. Esta modificación consiste en la unión de moléculas SUMO (SUMO-1, 2 ó 3, *small ubiquitin-like modifier*), estructuralmente similares a ubiquitina por acción de los complejos de enzimas: E1 que actúa como activador del proceso, E2 y E3 actúan como ligasas de las moléculas SUMO a la proteína final. La relevancia de este fenómeno estriba en la inhibición por parte de LXR y PPAR de genes proinflamatorios a través de la estabilización de los complejos correpresores NCoR o SMRT sobre los sitios de unión en los promotores de genes proinflamatorios.

2.1 Receptores X hepáticos: LXR.

Los receptores X hepáticos (LXR, *Liver X Receptors*) LXR α y LXR β están codificados por dos genes (NR1H3 y NR1H2 respectivamente) en dos cromosomas distintos (11 y 19 en humano, 2 y 7 en ratón). Su nombre se debe a que uno de los grupos que identificó LXR α inicialmente, encontró que su expresión era abundante en el hígado (Apfel et al., 1994) (Willy et al., 1995) (Teboul et al., 1995). Estos receptores funcionan como sensores de colesterol, siendo sus ligandos a menudo metabolitos intermediarios del metabolismo del colesterol, incluyendo formas oxidadas también llamadas oxisteroles: 22-(R), 24-(S) y 27-hidroxicolesterol y 24-(S), 25-epoxicolesterol. Se han desarrollado potentes ligandos sintéticos que activan la función de LXR, como T0901317 y GW3965, así como el ligando que actúa como antagonista GSK1440233A (GW233), debido a su capacidad de bloquear la interacción con otras proteínas activadoras por su gran volumen (Zuercher et al., 2010). También se ha observado que concentraciones elevadas de D-glucosa (Mitro et al., 2007) y β -sitosterol son capaces de activar estos receptores (Plat et al., 2005).

Un artículo recientemente publicado basado en estudios genómicos y análisis funcionales defiende que los receptores LXR no se originaron en el ancestro común de los mamíferos, sino previamente a la radiación de los gnatóstomos (vertebrados con mandíbulas). Tras el origen de los ortólogos de LXR, en algunos linajes uno o ambos genes se han perdido con el curso de la evolución (Fonseca et al., 2017).

LXR α (447 aminoácidos) y LXR β (460 aminoácidos) comparten más del 75% de similitud de secuencia en los dominios DBD y LBD, tanto en humanos como en roedores. Los conjuntos de genes diana que controlan tienen un elevado grado de solapamiento y funcionalmente cada receptor compensa al otro en la mayoría de los contextos biológicos (Hong y Tontonoz, 2008). A pesar de estas similitudes estructurales y funcionales, la distribución a nivel tisular de los receptores es muy diferente. LXR β se expresa de forma ubicua, pero LXR α se distribuye de manera tejido-específica: siendo más abundante en tejidos metabólicos como el hígado, tejido adiposo, intestino, riñón, glándulas adrenales y macrófagos (Repa y Mangelsdorf, 2000).

2.1.1. Funciones de los receptores nucleares LXR en el metabolismo lipídico.

Los receptores LXR tienen un papel principal en la regulación del metabolismo del colesterol: la primera evidencia de ello fue el descubrimiento en ratón de la regulación de la transcripción del gen que codifica la enzima CYP7A1 (Peet et al., 1998), la cual interviene en el paso limitante de la conversión del colesterol en ácidos biliares. Estos receptores nucleares tienen un papel crucial en el transporte reverso de colesterol, desde el interior de las células al exterior, muy relevante en macrófagos y enterocitos, hacia moléculas aceptoras en el plasma sanguíneo. En esta función intervienen de forma directa los genes diana de LXR de tipo transportadores dependientes de ATP como ABCA1 (Venkateswaran et al., 2000a), ABCG1 (Venkateswaran et al., 2000b), ABCG5 y ABCG8 (Repa et al., 2002), pero también otro tipo de proteínas como ARL7 (ARL4C, factor de ADP ribosilación) intervienen en el proceso (Hong et al., 2011) (Fig. 6). La importancia de este mecanismo se pone de manifiesto en casos como la enfermedad de Tangier, en la que la proteína ABCA1 no es funcional y el transporte reverso de colesterol no se produce. Los pacientes sufren una marcada deposición de colesterol en tejidos periféricos, una ausencia casi total de HDL sanguíneo y frecuentemente mueren de enfermedades vasculares a una edad temprana. Igualmente, mutaciones en los genes de ABCG5 o ABCG8 causan la sitosterolemia, consistente en la hiperabsorción de colesterol y el consecuente aumento del riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares (Revisado en Calkin y Tontonoz, 2012).

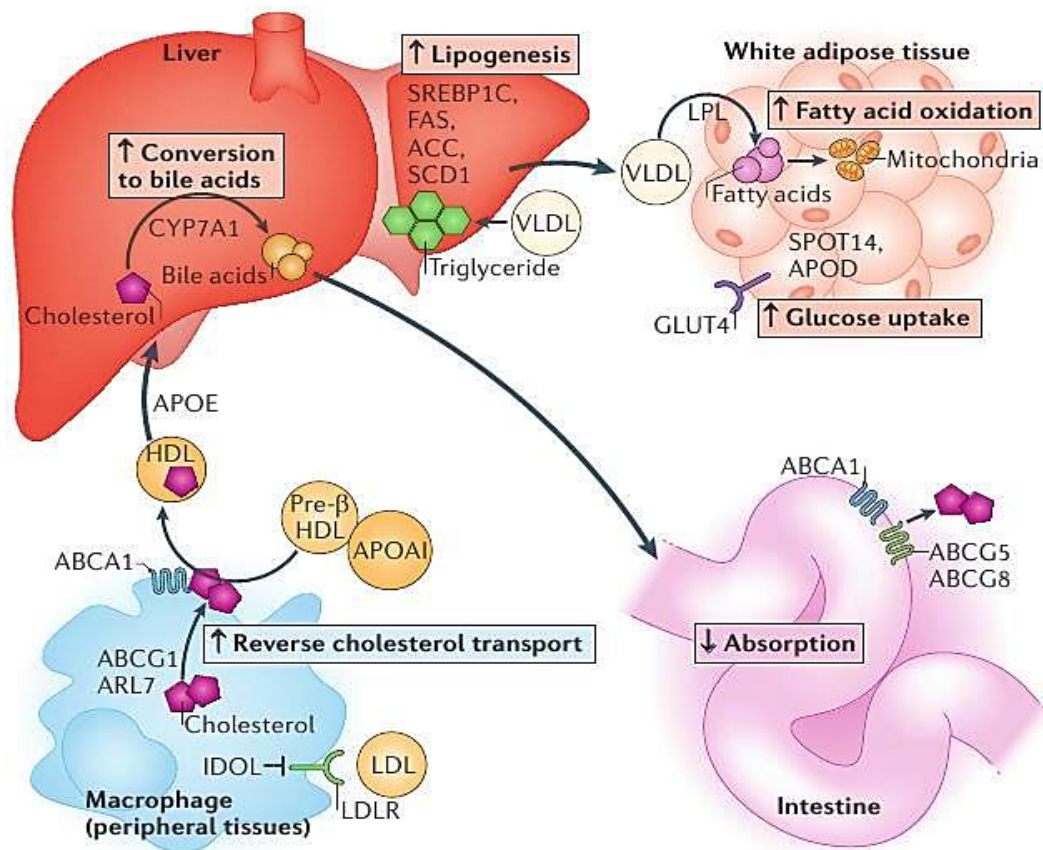


Figura 6. Efectos del LXR en el metabolismo a nivel sistémico. El receptor nuclear LXR coordina diversos efectos sobre el metabolismo de forma tejido-específica. En tejidos periféricos y en macrófagos este receptor regula la transcripción de la enzima IDOL, que degrada el receptor de LDL y frena la captación de colesterol en la célula. De la degradación de estas partículas de LDL se libera colesterol que es transportará a través de ABCA1, ABCG1 y ARL7 a apolipoproteínas (APOA1) y partículas de HDL inmaduras (pre-β HDL), que circularán hasta el hígado. En el hígado los receptores LXR regulan la transcripción de genes implicados en la síntesis de ácidos grasos, *Srebf1*, *Fasn*, *Acc*, *Scd1*, que se liberarán al torrente circulatorio acoplados a lipoproteínas en partículas VLDLs. También se produce la conversión del colesterol en ácidos biliares con la enzima CYP7A1, para su secreción en el lumen del intestino. Es allí donde se limita la absorción de colesterol proveniente de la dieta, transportándolo de forma reversa a través de ABCA1, ABCG5 y ABCG8. En el tejido adiposo regula la captación de glucosa a través de GLUT4 y el transporte de lípidos y su oxidación a través de APOD y SPOT14 respectivamente. Adaptado de Calkin y Tontonoz, 2012.

Sin embargo, aunque la activación de los receptores LXR sería un objetivo muy válido para el tratamiento de la hipercolesterolemia, un aspecto negativo que retrasa en gran medida el diseño de medicamentos es el hecho de que estos receptores también poseen un control sobre la síntesis de ácidos grasos. Dirigen la transcripción de genes cuyas proteínas tienen funciones claves en la biogénesis de ácidos grasos como son *Srebf1* (factor de unión al elemento de respuesta a esteroides 1, considerado un regulador esencial de la síntesis de ácidos grasos),

Fasn (sintasa de ácidos grasos), *Scd1* (estearoil-CoA desaturasa 1), *Acc* (*Acaca*, acetil-CoA carboxilasa) y *Elovl5* (elongasa de cadenas largas de ácidos grasos) (Heinz et al., 2010) (Fig. 6). Debido a que un exceso de colesterol circulante es tóxico, este mecanismo proporciona ácidos grasos como base para su esterificación con el colesterol, logrando así su retirada. Esta función se atribuye principalmente a la acción de LXR α hepático (Zhang et al., 2012), por lo que una búsqueda de fármacos dirigidos exclusivamente a LXR β podría ser una solución viable para evitar estos efectos secundarios.

En el tejido adiposo blanco (WAT), la activación de los receptores LXR inducen la expresión de genes implicados en el metabolismo de ácidos grasos (*Spot14* o *Thrsp*), transporte lipídico (*Apod*) y también en el metabolismo de la glucosa, como es el gen *Glut4*, que media la captación de glucosa en respuesta a insulina (Fig. 6).

2.1.2. Funciones de los receptores nucleares LXR en macrófagos.

Como anteriormente se ha descrito, los macrófagos son células fagocíticas profesionales que están presentes en prácticamente todos los tejidos y desempeñando una importante función de defensa del organismo, pero adicionalmente a su papel en el sistema inmunitario también juegan papeles muy relevantes en el metabolismo. Además, debido a su capacidad fagocítica son células claves en la retirada de células apoptóticas y moléculas oxidadas de colesterol. La acumulación de grandes cantidades de colesterol en el macrófago es un proceso que conlleva su transformación en células “espumosas” (cargadas de lípidos en su interior) y su deposición en las paredes interiores de los vasos, lo que marca el inicio del desarrollo de la aterosclerosis.

I. Aterosclerosis.

La importancia fisiológica de las funciones de los receptores nucleares LXR en el contexto de la aterosclerosis se pone de manifiesto en modelos de ratón de esta enfermedad, carentes del gen *Apoe* o *Ldlr*, en los que el tratamiento con el agonista específico de LXR, GW3965, redujo la extensión de las lesiones ocasionadas en las aortas hasta en un 50% e indujo en ellas la expresión de los genes *Abca1* y *Abcg1* (Joseph et al., 2002). Otra evidencia es que el trasplante de médula ósea de ratones LXR DKO en ratones *Apoe* KO o *Ldlr* KO resultó en un incremento significativo del desarrollo de la lesión (Tangirala et al., 2002). Asimismo, la deficiencia sistémica de LXR α en ratones *Apoe* KO o *Ldlr* KO está asociada con el desarrollo acelerado de la aterosclerosis, lo que sugiere un papel dominante de LXR α en el control de la enfermedad y el hecho de que LXR β no es suficiente para compensar la falta de LXR α bajo condiciones de hipercolesterolemia (Bradley et al., 2007) (Bischoff et al., 2010). La evidencia definitiva del papel crucial del LXR α en macrófagos en el progreso de la aterosclerosis es ofrecida por un estudio en el que LXR α es expresado fuertemente bajo el control de un promotor específico de macrófago, lográndose una reducción de la placa aterosclerótica en el modelo de ratón *Ldlr* KO (Teupser et al., 2008).

II. Metabolismo del colesterol.

Los receptores LXR también activan en el macrófago la producción de apolipoproteínas: *ApoD*, *ApoE* y el grupo de genes *ApoCI*, *ApoCII* y *ApoCIV* (Mak et al., 2002), que unirán el colesterol que se transporta de forma reversa desde el interior de las células. Además de la expresión de apolipoproteínas, regulan la expresión de enzimas de remodelamiento de las mismas, como CETP (proteína de transferencia de ésteres de colesterol) (Luo y Tall, 2000) LPL (lipoproteína lipasa) o PLTP (proteína de transferencia de fosfolípidos, desde lipoproteínas ricas en triglicéridos a partículas HDL) (Laffitte et al., 2003) y modulan la captación de partículas de colesterol a través de la producción de la proteína MYLIP o IDOL (E3 ubiquitín-ligasa que controla la degradación de los receptores de LDL, VLDL y apoE) (Zelcer et al., 2009).

III. Rutas de señalización inflamatorias.

La activación de los receptores LXR también tiene consecuencias sobre las rutas de señalización inflamatorias en macrófagos. Se ha comprobado sobre modelos de inflamación murinos de inducción de dermatitis alérgica por contacto provocados por forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), que ambas proteínas LXR bloquean la inducción de genes inflamatorios clásicos como iNOS (óxido nítrico sintasa inducible), COX-2 (ciclooxigenasa 2), IL-6 (interleuquina 6) (Joseph et al., 2003) cuando son activadas con su ligando específico sintético, GW3965. También la expresión de metaloproteína 9 (MMP-9) tras la exposición del macrófago con LPS, IL-1 β o TNF- α se ve reducida por la activación de las proteínas LXR (Castrillo et al., 2003a). Adicionalmente los receptores LXR regulan la transcripción del gen con actividad antiinflamatoria arginasa II (Marathe et al., 2006). Esta proteína metaboliza la conversión del nitrógeno en poliaminas, que tienen un papel muy relevante en la proliferación celular y la cicatrización de heridas. El mecanismo de acción antiinflamatorio se explica porque su sustrato, la L-arginina, es el mismo que el de otras enzimas, como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS o *Nos2*), por lo que la utilización de la L-arginina por la arginasa disminuye la producción de óxido nítrico. Recientemente, un nuevo estudio ha demostrado que la capacidad antiinflamatoria de los receptores LXR reside principalmente en la inducción de la expresión de ABCA1, que al promover el transporte reverso de colesterol induce una remodelación de los lípidos de la membrana y las balsas lipídicas, alterando la organización de complejos de proteínas asociados a ellas como MyD88 y TRAF6, implicados en la señalización por TLR2, 4 y 9 (Ito et al., 2015).

Se ha señalado que los patógenos agravan el proceso de formación de células “espumosas” en aterosclerosis y aceleran la formación de lesiones en los vasos. Estudios epidemiológicos han revelado que la incidencia de enfermedades cardiovasculares es mayor en pacientes con infecciones crónicas (Rassu et al., 2001). Un estudio comprobó que efectivamente los receptores TLR3 y TLR4, activados a través de ADN vírico y LPS respectivamente, bloquean la señalización de los receptores LXR de forma independiente a MyD88 y NF κ B, a través del factor de transcripción IRF3 (Castrillo et al., 2003b). En parte el mecanismo se explica porque existe una competición de IRF3 y LXR por la unión de los coactivadores transcripcionales CBP/p300.

IV. Retirada de células apoptóticas.

La muerte celular puede producirse por distintas causas, por ejemplo como resultado de un trauma o daño, pero también puede ser una muerte celular programada, conocida con el nombre de apoptosis. Este tipo de muerte tiene lugar cuando es necesaria una renovación de las células del organismo y asegura el buen funcionamiento de los tejidos. Otra función muy importante derivada de la activación del receptor LXR en el macrófago y que contribuye al mantenimiento de la homeostasis celular es la retirada de células apoptóticas del organismo.

Un estudio llevado a cabo en nuestro laboratorio ha revelado que los receptores LXR regulan la expresión de la proteína MER, un receptor tirosina quinasa que une fosfatidilserina, la cual se encuentra normalmente formando parte de la bicapa lipídica interna de las membranas celulares y se expone cuando la célula muere (A-Gonzalez et al., 2009). Este receptor es fundamental para la captación de restos celulares circulantes que posteriormente serán degradados. Se comprobó que la fagocitosis de timocitos apoptóticos *in vitro* activa la expresión de otros genes diana de LXR como son *Abca1*, *Abcg5* o *Pltp*. El mecanismo de activación de LXR se produce a través del colesterol aportado por las membranas celulares fagocitadas. Todo ello activa un proceso de retroalimentación positiva en el macrófago, favoreciendo la captación de más restos celulares. Asimismo, los macrófagos de ratones LXR DKO han demostrado un defecto en la fagocitosis y retirada de timocitos apoptóticos, lo que lleva a una señalización inflamatoria defectuosa y exacerbada asociada a este proceso. Sin embargo, la capacidad de fagocitar esferas de látex fluorescentes y bacterias *E. coli* no se vio afectada de forma relevante. Como consecuencia de estos defectos, se detectó un aumento en la predisposición a padecer enfermedades autoinmunes, desarrollando los ratones LXR DKO autoanticuerpos y glomerulonefritis autoinmune. Una administración crónica del ligando GW3965 en ratones modelo para la enfermedad de lupus eritematoso sistémico (ratones B6^{lpr/lpr}) aumentó la activación de LXR y la expresión de *Mer*, frenando con éxito el avance de la enfermedad (A-Gonzalez et al., 2009).

2.1.3. Funciones específicas de los receptores LXR α y LXR β .

2.1.3.1. Funciones específicas de LXR α .

Como ya se ha comentado anteriormente, diversos estudios han demostrado que LXR α tiene el control principal de la regulación del metabolismo del colesterol, por ejemplo su retirada en forma de ácidos biliares (Peet et al. 1998), así como en la síntesis de ácidos grasos (Zhang et al., 2012). Estas funciones vienen asociadas a una mayor expresión de LXR α en tejidos como el hígado, tejido adiposo, intestino, riñón y macrófagos (Repa y Mangelsdorf, 2000).

Experimentos en el contexto de la apoptosis mediada por estrés del retículo endoplásmico debido a una presencia excesiva de lípidos tóxicos y bioactivos, se examinó la síntesis de ácidos grasos controlada por los genes *Scd1* y *Fasn* en macrófagos carentes del gen

Fabp4 (proteína de unión de ácidos grasos, *fatty acid binding protein* o aP2). La expresión de estas enzimas se encontraba aumentada y resultaba directamente dependiente de la actividad de LXR α (Erbay et al., 2009), indicando una función exclusiva de LXR α en la regulación de estas enzimas en el contexto de la ausencia de aP2, lo que presuntamente podría ser extensible al genotipo salvaje.

Posiblemente una de las funciones más llamativas que recae exclusivamente sobre LXR α es su intervención en la generación de la población de macrófagos de la zona marginal del bazo. Este órgano linfoide secundario está compartimentalizado en dominios donde residen distintos tipos de macrófagos que desempeñan funciones variadas (Davies et al., 2013) (Fig. 7). La composición de macrófagos está de acuerdo con los papeles del bazo como filtro sanguíneo: aquí tiene lugar la presentación antigénica y organización de una respuesta inmunitaria adaptativa, así como la destrucción de eritrocitos senescentes y metabolismo del hierro entre otras funciones. La zona marginal se dispone alrededor de los folículos de pulpa blanca donde se agrupan los linfocitos T y B, separando estas áreas de la pulpa roja que ocupa el resto del órgano. Las dos poblaciones de macrófagos se distinguen por la expresión de diferentes marcadores: los macrófagos de la zona marginal, que expresan la lectina SIGN-R1 (DC-SIGN), el receptor de fagocitosis o *scavenger* MARCO y el receptor de fosfatidilserina TIM4 y los macrófagos metalofílicos de la zona marginal, que expresan sialoadhesina o CD169. En ausencia de expresión de LXR α se observa un defecto en el desarrollo de estas dos subpoblaciones de la zona marginal del bazo, las cuales desaparecen por completo (A-Gonzalez et al., 2013).

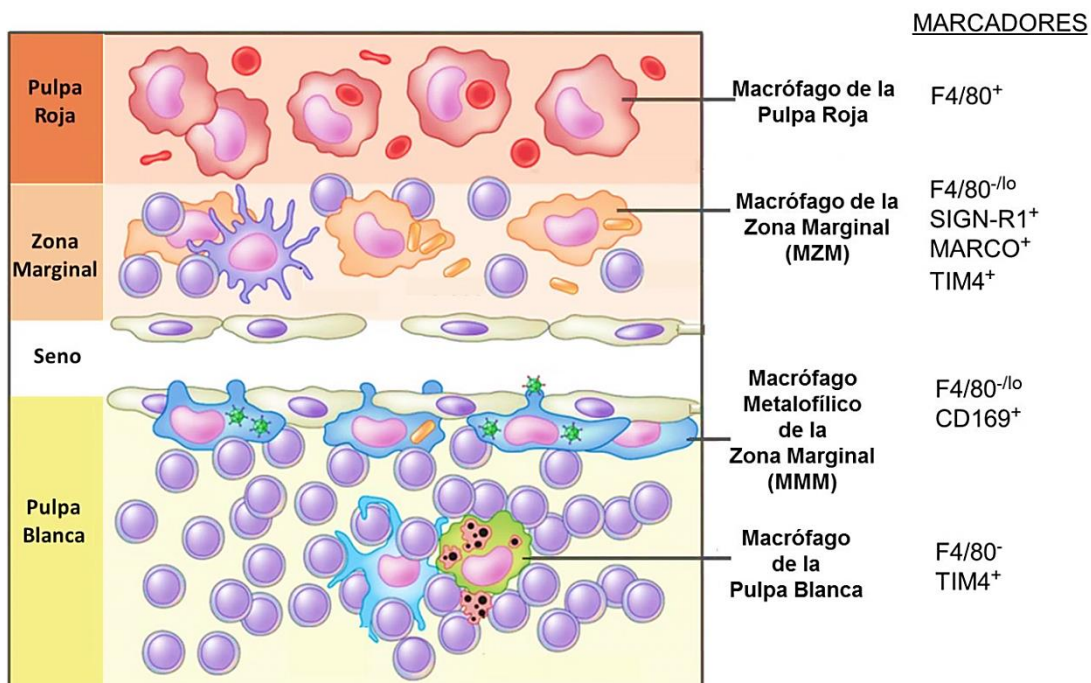


Figura 7. Organización de la estructura del bazo y las poblaciones de macrófagos esplénicos. Se representan en este esquema las distintas poblaciones de macrófagos que residen en cada compartimento del bazo y en la parte derecha los marcadores moleculares que caracterizan a cada tipo de macrófago. Adaptado de Davies et al., 2013.

Por otro lado, LXR α es fundamental para la supervivencia del macrófago ante una infección por *Listeria monocytogenes* (Joseph et al., 2004), lo cual se debe al menos en parte a la inducción del gen antiapoptótico *Aim*, también conocido como *Cd5l*, *Api6* o *Spa* (*Apoptosis Inhibitor of Macrophage*). Se trata del único gen descrito hasta ahora exclusivamente regulado por LXR α (Joseph et al., 2004) (Valledor et al., 2004).

Se han observado otros genes diana que, a pesar de ser regulados por ambos LXR, pueden ser más prominentemente regulados por el gen LXR α en comparación con LXR β . El gen con propiedades antiinflamatorias arginasa II ya comentado es uno de ellos (Marathe et al., 2006), pero también se ha observado este fenómeno para el gen *Arl7* (*Arl4c*) (Hong et al., 2011).

Finalmente, parece ser que algunas modificaciones postranscripcionales son exclusivas de LXR α , como la fosforilación en la serina 198 que no se produce en LXR β , afectando a la expresión de los genes diana de forma gen-específica (Torra et al., 2008).

2.1.3.2. Funciones específicas de LXR β .

Se conoce con menor profundidad las funciones biológicas específicas que podrían estar bajo el control preferente del receptor LXR β o si posee la capacidad de activación transcripcional exclusiva de algún gen, pero existen algunos estudios que respaldan la hipótesis de que efectivamente podría ser este el caso.

El gen LXR β podría tener un papel en el control de la proliferación celular, según indica un estudio en el que se ha relacionado LXR β con la proliferación y la inmunidad adquirida (Bensinger et al., 2008). La homeostasis del colesterol en células T y B, parece que pudiera estar controlada mayoritariamente por el transportador de colesterol y fosfolípidos *Abcg1*, que como hemos comentado, es gen diana de LXR. *Abcg1* sería crucial para el control de la división celular, adquiriendo una ventaja proliferativa los linfocitos provenientes de ratones LXR β KO. Asimismo, la pérdida de LXR β ocasiona esplenomegalia e hiperplasia linfoide y una respuesta exacerbada a antígenos, indicando que la regulación de esteroides dependiente de LXR β es importante en la respuesta inmunitaria. Es posible, sin embargo, que el papel prominente de LXR β en linfocitos se deba a que la expresión de LXR α es prácticamente inexistente (Bensinger et al., 2008).

Al igual que sucedía con LXR α , existen evidencias de que la expresión de algunos genes diana de LXR pueda estar controlada preferentemente por LXR β , sin que eso suponga que la regulación sea exclusivamente controlada por este receptor. Un ejemplo es *Vegfa* (*Vascular Endothelial Growth Factor*), una citoquina expresada en macrófagos que estimula la angiogénesis y neovascularización. Se ha comprobado que la expresión de *Vegfa* en macrófagos peritoneales murinos carentes del gen LXR β es aproximadamente la mitad de la expresión que alcanza en un individuo WT o LXR α KO, cuando son tratados con una combinación de ligandos de LXR y RXR (T0901317 y LG268 respectivamente) (Walczak et al., 2004), lo que lo convierte en un gen diana preferentemente dependiente de LXR β para su expresión. Otro ejemplo es el gen *ApoC1*, que dentro del grupo de genes (*cluster*) de apolipoproteínas C tiene una regulación más

ligada a la presencia de LXR β que a LXR α , si bien el trabajo que describe su regulación no ahondó en detalle en dicha observación (Mak et al., 2002).

En un estudio llevado a cabo en macrófagos derivados de médula ósea para examinar el papel de cada receptor LXR en el contexto de la aterosclerosis, se comprobó que LXR β tiene un papel modulador de la expresión de los genes diana *Abca1*, *Abcg1* y *Srebf1*. En este estudio se compararon los niveles de expresión de estos genes tras la delección de LXR α o LXR β , alcanzándose niveles más elevados en ausencia de LXR β (Bischoff et al., 2010), lo que sugiere que en condiciones normales, LXR β podría estar controlando la fuerte inducción de estos genes por LXR α .

Por tanto, a pesar de que existen evidencias del papel individual de LXR α y LXR β en el control de ciertas funciones biológicas, este aspecto de los receptores nucleares LXR no ha sido explorado exhaustivamente. En la presente Tesis Doctoral hemos abordado esta cuestión para identificar las funciones biológicas en las que los receptores LXR están involucrados diferencial o comúnmente, a través de su perfil transcripcional.

3. Modificaciones postraduccionales de las histonas.

En el núcleo de las células eucarióticas el ADN se organiza superempaquetado en forma de cromosomas, los cuales están constituidos por hebras de cromatina. A su vez la cromatina está formada por la doble hebra de ADN envolviendo los octámeros de histonas (formando nucleosomas) a modo de “collar de cuentas”. La estructura se mantiene altamente compactada por la acción de otras proteínas de andamiaje como la histona H1, que estabiliza los nucleosomas unidos en la fibra de cromatina (Felsenfeld y Groudine, 2003) (Fig. 8).

Los nucleosomas están compuestos de dos copias de cada una de las histonas: H2A, H2B, H3 y H4. Las histonas son proteínas básicas de secuencia altamente conservada que tienen gran afinidad por el ADN, que posee carga negativa. En un inicio se pensaba que sus funciones eran meramente estructurales, pero el hallazgo de modificaciones postraduccionales en ellas, concretamente la acetilación y su influencia sobre la accesibilidad de otras moléculas al ADN, relacionaron estas proteínas con funciones activas en el control de la transcripción (revisado en Matthews y Waterborg, 1985) (revisado en Pfeffer y Vidal, 1991). Adicionalmente a la acetilación, existen otras modificaciones que pueden afectar a las histonas: metilaciones, fosforilaciones, ubiquitinaciones, ADP-ribosilaciones, SUMOilaciones, deiminaciones e isomerización de prolinas. Estas modificaciones se producen de forma reversible en los residuos aminoacídicos del extremo N-terminal de la histona, que quedan libres de empaquetamiento, lo que se denomina “cola de la histona”.

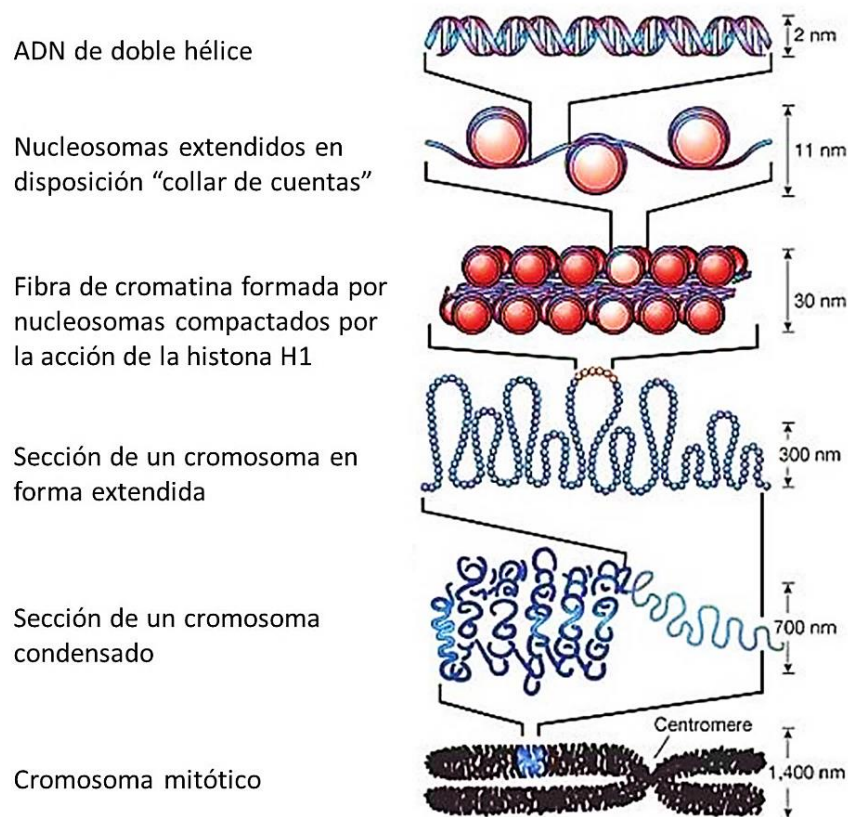


Figura 8. Organización del ADN en la hebra de cromatina y el cromosoma. El nivel de menor empaquetamiento es el nucleosoma, visto al microscopio electrónico como un "collar de cuentas", en el que el ADN envuelve el octámero de histonas con aproximadamente de 200 pares de bases. El siguiente nivel de empaquetamiento es la fibra de cromatina, formada por los nucleosomas enrollados y estabilizados por la histona H1. A su vez las fibras se van empaquetando en estructuras de órdenes superiores hasta formar el cromosoma mitótico. Adaptado de Felsenfeld y Groudine, 2003.

En concreto, acetilaciones y metilaciones afectan a los residuos de lisina de la histona, aunque también pueden producirse metilaciones en los aminoácidos arginina. Las serinas y treoninas únicamente sufren fosforilaciones, el ácido glutámico experimenta ADP-ribosilación, la isomerización es propia del aminoácido prolina y sólo la arginina puede sufrir deiminación para su conversión en citrulina. La mayoría de estas modificaciones ocurren en la histona H3, pero también pueden darse acetilaciones, metilaciones y fosforilaciones en la histona H4 y ubiquitinaciones y acetilaciones en las histonas H2A y H2B (Kouzarides, 2007). En cuanto a los grupos metilo añadidos a las lisinas, pueden adicionarse uno, dos o tres residuos en la misma histona (mono, di y trimetilaciones) y en las argininas pueden coexistir uno o dos metilos, añadiendo todo ello un grado más de complejidad al sistema. Análisis de espectrometría de masas en células fibroblásticas embrionarias de ratón (MEFs) han revelado que en una misma histona H3 pueden encontrarse hasta dos tipos de modificaciones diferentes al mismo tiempo, por ejemplo dimetilaciones en la lisina 36 (H3K36me2) y acetilaciones en la lisina 27 (H3K27Ac)

(Jin et al., 2011), siempre que ocupen posiciones no excluyentes. De este modo, se establece una comunicación o *crosstalk* entre las histonas, en la que incluso la ocurrencia de unas modificaciones puede condicionar o favorecer la aparición de otras (Kouzarides, 2007).

3.1. Relevancia biológica de las modificaciones postraduccionales a nivel transcripcional.

La acetilación y fosforilación son modificaciones que se han relacionado inequívocamente con la activación de la transcripción. De todas las modificaciones que se producen en las histonas, la acetilación es la que tiene mayor potencial para debilitar las uniones intra e internucleosomales, debido a que su efecto es la neutralización de las cargas positivas de los extremos N-terminales de la lisina. Análisis de los patrones de acetilación en histonas a nivel genómico en células de mamífero ha confirmado la correlación entre la acetilación en histonas y la activación génica. Las acetilaciones en las lisinas 9, 18 y 27 de la histona H3 (H3K9, H3K18 y H3K27) están enriquecidas en torno al sitio de inicio de la transcripción (TSS), mientras que las acetilaciones en la histona H4 están presentes en el promotor y en regiones transcritas de genes activos (Wang et al., 2008). Por otro lado, la deacetilación, SUMOilación, deiminación e isomerización de prolinas se ha relacionado con la represión transcripcional. La metilación y ubiquitinación, a diferencia de las anteriores, pueden estar implicadas en ambas dependiendo del contexto del ADN y de la propia histona. Por ejemplo, la metilación de la lisina 36 en la histona H3 (H3K36me) tiene una función represora cuando se encuentra en el promotor y activadora si se encuentra en una región codificante del gen (Kouzarides, 2007).

Diversas familias de enzimas responsables de estos cambios en las histonas han sido caracterizadas en los últimos años: las acetiltransferasas (HATs, *Histone Acetyltransferases*), forman parte de los llamados complejos proteicos coactivadores de la transcripción, por los efectos que causa la acetilación sobre la unión histona-ADN. Pertenecientes a este primer grupo se encuentran principalmente tres familias: GNAT, MYST y CBP/p300 (Sternier y Berger, 2000). Las histona deacetilasas (HDACs, *Histone Deacetylase*) están asociadas con la represión transcripcional y actúan coordinadamente con las HATs para el control de la transcripción. Las HDACs suelen formar parte de complejos proteicos correpresores. En este grupo se encuentran las clases I, II y III, siendo estas últimas enzimas NAD-dependientes de la familia Sir.

En conclusión, las modificaciones descritas ocasionan la relajación o el estrechamiento en la unión entre histona y ADN, condicionando el acceso de otras proteínas (como los factores de transcripción) a las secuencias de ADN próximas a estas modificaciones. Todas estas alteraciones constituyen un “código de lenguaje” de las histonas que influye en muchos procesos biológicos fundamentales, como son la transcripción y el silenciamiento génicos, la replicación y la reparación del ADN.

3.2. Modelo tradicional de activación transcripcional dependiente de receptores nucleares.

De acuerdo con modelos moleculares convencionales de transcripción dependiente de receptores nucleares, en ausencia de ligando (considerándose, sin embargo, la situación de ausencia total de ligando *in vivo* improbable) éstos se encuentran constitutivamente unidos al ADN asociados con proteínas correpresoras como NCoR (NCOR1, *Nuclear Receptor Corepressor*, Correpresor de Receptores Nucleares) y SMRT (NCOR2, *Silencing Mediator of Retinoic Acid and Thyroid Hormone Receptor*, Mediador de Silenciamiento para Receptores Retinoides y Tiroideos) (Rosenfeld et al., 2006) (Perissi et al., 2010). NCoR y SMRT forman complejos correpresores muy similares entre sí que han sido caracterizados con cierta profundidad (Rosenfeld et al., 2006). Estos complejos se forman por asociación de proteínas que desempeñan diversas funciones, contribuyendo a mantener un estado de represión de la transcripción mediante la unión a los receptores nucleares. Entre ellas pueden encontrarse proteínas como ZBTB33, que reconocen metilaciones en el ADN y dirigen la localización del complejo correpresor, enzimas ATPasas que remodelan la estructura de la cromatina a través de cambios en la disposición de los nucleosomas y facilitan la actuación de enzimas modificadoras de histonas, función clásicamente desempeñada por HDAC3 (Glass y Ogawa, 2006) (Fig. 9). Según este modelo, la unión del ligando desencadenaría un cambio estructural en el receptor nuclear que desplaza a los correpresores y facilita la interacción con proteínas coactivadoras, como las pertenecientes a la familia SRC (*Steroid Receptor Coactivator*, Coactivador de Receptores Esteroideos) que precede a la llegada de la maquinaria básica de transcripción, activándose la transcripción génica. Este proceso de liberación activa del complejo correpresor se denomina “desrepresión” y puede producirse por distintos mecanismos: fosforilación y exportación de las proteínas correpresoras a otro compartimento celular o mediante su ubiquitinación, lo cual en los complejos de NCoR y SMRT se realiza por componentes intrínsecos al complejo, TBL1 y TBLR1 (Perissi et al., 2004).

Sin embargo, a raíz de unos experimentos realizados sobre el receptor de estrógenos alfa, se comprobó que para la activación de la transcripción, adicionalmente al requerimiento de proteínas coactivadoras, era necesaria la presencia cíclica de enzimas histona-deacetilasas (HDAC) y complejos remodeladores de la cromatina (Métivier et al., 2003). En vista de estos resultados la naturaleza altamente dinámica y versátil de este sistema comenzó a desvelarse, siendo necesario reexaminar el modelo aceptado hasta ese momento. De igual modo, así como la represión de la transcripción se ha asociado desde un principio con la presencia constitutiva de complejos correpresores, ha podido comprobarse que genes silenciados a largo plazo no se encuentran unidos a ellos. En su lugar, presentan modificaciones en las histonas, principalmente di y trimetilaciones en la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me2/3), producidas por el complejo correpresor Polycomb, lo que desencadena una compactación mayor de la cromatina y bloquea el acceso a la unión de factores de transcripción y proteínas coactivadoras (Cao et al., 2002).

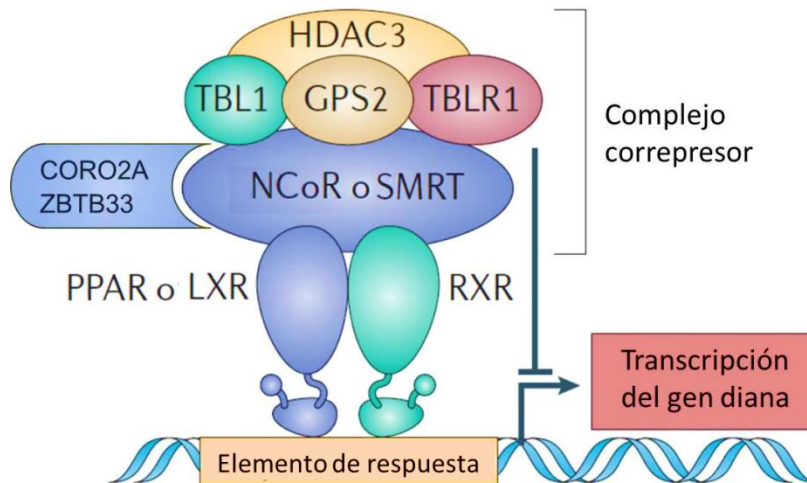


Figura 9. Esquema simplificado de la organización del complejo correpresor NCoR y SMRT. Estructura del complejo correpresor NCoR y SMRT donde se muestran las proteínas que forman parte de él: histona deacetilasa 3 (HDAC3), transducina- β tipo 1 y su receptor (TBL1 y TBLR1) con actividad ubiquitinasa, supresor 2 de la ruta de proteínas G (GPS2), coronina A2 (CORO2A) que une el citoesqueleto de actina para ayudar a liberar el complejo correpresor y proteína con dedos de zinc y dominio BTB, también llamada Kaiso (ZBTB33) que reconoce ADN metilado (sólo presente en complejos correpresores NCoR). El complejo se encuentra acoplado a los receptores nucleares, situados sobre la secuencia canónica de respuesta que reconocen, mientras no estén unidos a ligando. Adaptado de Glass y Ogawa, 2006.

3.3. Modelo de activación transcripcional en macrófagos en respuesta a inflamación.

Estudios recientes basados en técnicas de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP y ChIP acoplado a secuenciación masiva) han conseguido esclarecer de manera pionera la secuencia de acontecimientos que tienen lugar tras la activación de los receptores nucleares, especialmente en contextos de inflamación en macrófagos, así como algunos de los elementos moleculares importantes que forman parte del proceso.

Trabajos realizados fundamentalmente por los grupos de Christopher Glass y de Gioacchino Natoli, descubrieron mediante una serie de experimentos de ChIP la localización de la unión a nivel genómico del factor determinante de linaje PU.1 (conocido como Spi-1), expresado de forma común por células muy dispares como son los macrófagos y las células B. Los factores determinantes de linaje, también llamados reguladores maestros o factores pioneros, son determinantes en el desarrollo de un tipo celular concreto. La proteína PU.1 (*Purine-rich box 1*) es un factor de transcripción de la familia ETS (*E-twenty six*) que tiene funciones importantes tanto en la diferenciación celular (en la hematopoyesis posee un papel clave) como en células ya diferenciadas (Sharrocks, 2001).

Se observó que la unión de PU.1 en el genoma es dependiente de la colaboración con un reducido número de factores determinantes de linaje adicionales, como son C/EBP o AP-1 en macrófagos y OCT2, E2A y EBF en células B (Heinz et al., 2010). Estos factores adicionales se unen en un radio de hasta 100 pares de bases de distancia del sitio de unión de PU.1, controlando transcripcionalmente distintos genes en cada tipo celular. Las cuestiones que se abordan son, teniendo en cuenta que el mismo factor de transcripción (PU.1 en este caso) en diferentes tipos celulares se distribuye de forma distinta en el genoma y diferentes factores (C/EBP, AP-1, OCT2, etcétera) en el mismo tipo celular tienen igual patrón de unión, cuál es el mecanismo molecular que rige estos fenómenos para otorgar una identidad celular. La mayoría de las secuencias a las que se unen PU.1 junto con los factores mencionados tienen una localización concreta en el genoma. Se encuentran tanto en regiones promotoras potencialmente activas, identificadas por la presencia de marcas de trimetilación (H3K4me3) o incluidas en regiones genómicas de hasta varias kilobases de extensión llamadas secuencias potenciadoras de la transcripción o *enhancers* (Heinz et al., 2010).

Otra serie de trabajos de localización genómica de factores importantes fueron encaminados a estudiar más en profundidad las secuencias potenciadoras o *enhancers*. Estos elementos se distribuyen principalmente en regiones intergénicas o intrónicas (56% y 27% respectivamente) y frecuentemente (44% de las distribuciones intragénicas) cerca del inicio de la transcripción (TSS) de los genes a los que afecta, lo que se encuentra dentro de un radio de 20 kilobases (Ghisletti et al., 2010). La marca o huella molecular que los caracteriza consiste en modificaciones en la lisina 4 de la histona H3, de tipo monometilación (H3K4me1), combinada con bajos niveles de trimetilación (H3K4me3) (Heintzman et al., 2009). Adicionalmente, estas regiones monometiladas se encuentran unidas frecuentemente por el coactivador p300 (Heintzman et al., 2007). En macrófagos, estas regiones *enhancer* están además enriquecidas con numerosas secuencias de unión de factores de transcripción específicos de linaje, como PU.1 y de factores que actúan en respuesta a estímulos externos potencialmente dañinos como la inflamación o los microorganismos (Ghisletti et al., 2010).

En función de los cambios sufridos en las marcas de la cromatina en respuesta al estímulo inflamatorio LPS con el tiempo, se han distinguido cuatro tipos de *enhancers* estudiados inicialmente en macrófagos derivados de médula ósea (Ostuni et al., 2013): constitutivos (o activados), preparados (*poised*), latentes y reprimidos (Fig. 10).

- *Enhancers* constitutivos o activados: se caracterizan por presentar marcas de monometilación y acetilación (H3K4me1 y H3K27Ac) basalmente, ocasionándose tras 24 horas de tratamiento con LPS un aumento en la aparición de la marca de acetilación.
- *Enhancers* preparados (*poised*): presentan basalmente marcas de monometilación (H3K4me1), pero no de acetilación, aunque esta marca no siempre va a aparecer en los *enhancers* tras una exposición a LPS.

- *Enhancers* latentes: resultan indistinguibles por carecer de todo tipo de marcas de modificación y unión de PU.1 en células no tratadas con LPS. Adquieren marcas de monometilación H3K4me1 y acetilación H3K27Ac junto con la unión de PU.1 tras la exposición a corto plazo con LPS (4 horas). Generalmente tras ese tiempo la acetilación decae, independientemente del tiempo de duración del tratamiento. La ausencia inicial de PU.1 se explica por contener este tipo de *enhancers* sitios de unión de PU.1 de menor afinidad que en otras regiones (Ostuni et al., 2013).
- *Enhancers* reprimidos: aunque la monometilación (H3K4me1) en estos *enhancers* permanece inalterada con la exposición a LPS, la acetilación se muestra reducida en gran medida o es inexistente bajo estas condiciones. Adicionalmente presentan otros indicios de represión, como ausencia de actividad de la ARN polimerasa II.

Una característica común a los *enhancers* activos es que cuentan con actividad transcripcional, produciéndose de su secuencia un ARN *enhancer* (eRNA) que puede ser detectado por la técnica de Gro-seq (*Global Run-On Sequencing*) empleada para identificar y secuenciar ARN naciente a tiempo real y ARN de baja estabilidad (Daniel et al., 2014).

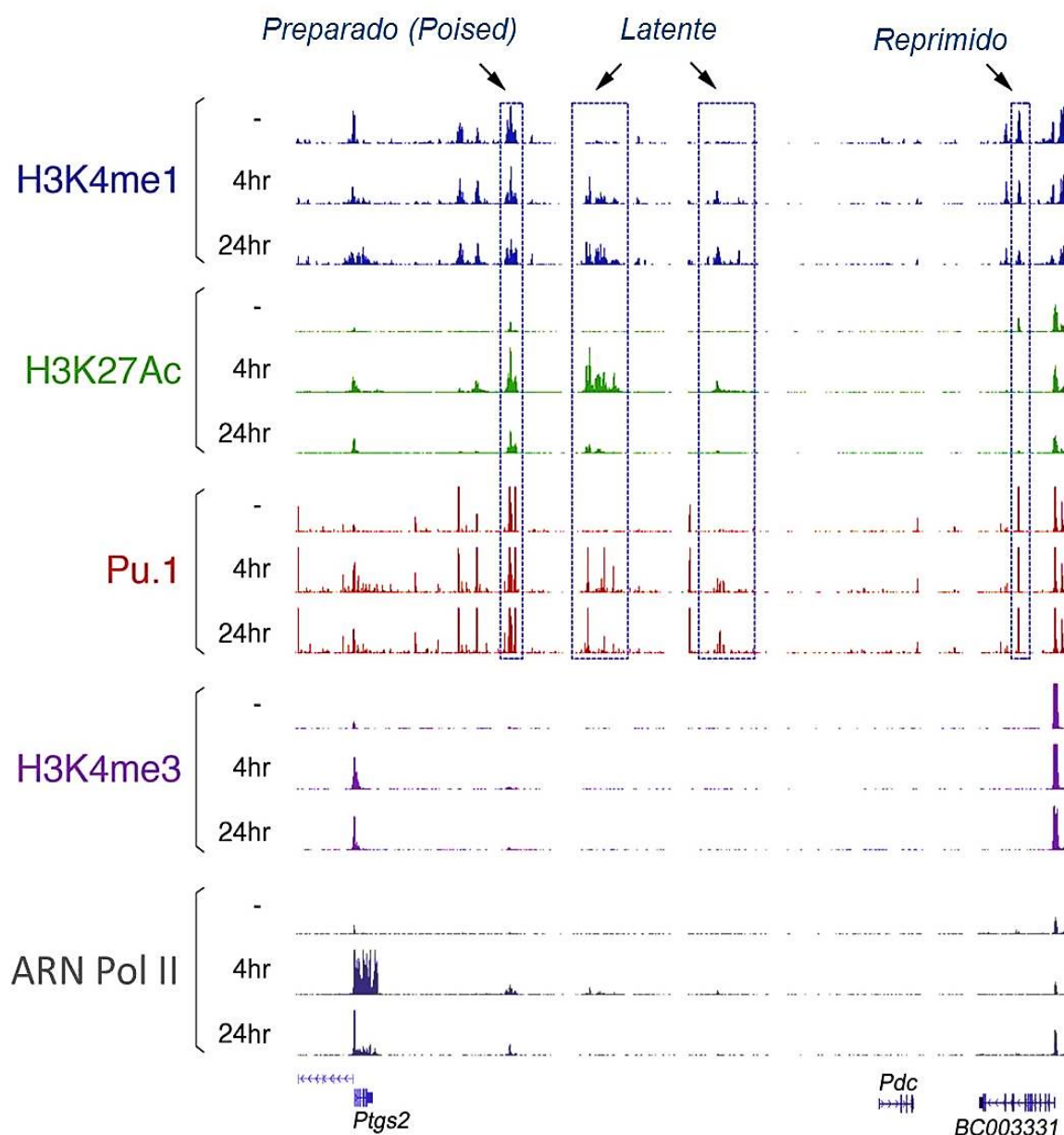


Figura 10. Región representativa del genoma de macrófagos donde se muestran distintos tipos de *enhancers*. Tras la exposición de macrófagos a LPS durante diferentes tiempos, se identifican en una misma región genómica mediante ChIP-seq la presencia o aparición de las marcas que caracterizan los *enhancers* preparados o *poised*, latentes y reprimidos: monometilación en la lisina 4 de la histona H3, acetilación de la lisina 27 de esta misma histona y unión del factor de transcripción PU.1. Asimismo, la presencia de otras marcas y complejos que confirman el estado relajado de la cromatina o la transcripción activa, como son la trimetilación en la lisina 4 de la histona H3 y la ARN polimerasa II respectivamente, complementan esta clasificación. Adaptado de (Ostuni et al., 2013).

Las marcas de monometilación en los *enhancers* tienen distribución bimodal a ambos lados de la unión de PU.1, encontrándose disminuidas en el centro de la posición de PU.1 y acrecentadas a ambos lados. A través de ensayos de silenciamiento y delección de PU.1 en macrófagos derivados de médula ósea y precursores de células B, se comprobó que la marca de monometilación característica de las regiones *enhancer* era dependiente de una unión inicial de PU.1 en los sitios genómicos propios de linaje celular con la ayuda de interacciones colaborativas de otros factores de transcripción como los ya mencionados: C/EBP, AP1 o E2A (Ghisletti et al., 2010) (Heinz et al., 2010). Esta unión induce una reorganización nucleosomal con la acción de enzimas remodeladoras de cromatina que descubren las secuencias de ADN que van a ser ocupadas a continuación. Una vez establecida la unión de los factores, las enzimas metilasas son atraídas y modifican con monometilaciones en los residuos de las histonas cercanas, delineando en el genoma potenciales elementos reguladores con alta accesibilidad a su secuencia. Esta primera remodelación facilita la unión de otro grupo de factores de transcripción que son, no sólo dependientes de linaje, sino que también se activan en respuesta a estímulos externos, como por ejemplo LXR, NFκB, STAT1 o IRF (Fig. 11).

Con cada exposición a señales externas que sufre la célula, se genera una marca epigenética de monometilación en su ADN y ante una segunda exposición al mismo estímulo, se ha comprobado la capacidad de los *enhancers* de retener una “memoria”. Se observa en ellos una cinética de acetilación en los *enhancers* más rápida y con niveles más elevados, facilitando una inducción génica más potente (Ostuni et al., 2013). Estudios en macrófagos han revelado que el grado de conservación de las secuencias de ADN en los *enhancers* involucrados en respuestas inflamatorias es muy elevado, pero no tanto como aquellos *enhancers* implicados en la diferenciación celular (Ghisletti et al., 2010).

Adicionalmente, se ha comprobado que los *enhancers* se encuentran estructuralmente en dominios de cromatina delimitados por la unión de las proteínas CTCF y cohesina (RAD21) (Daniel et al., 2014). Los *enhancers* situados en posiciones más distales pueden comunicarse con los promotores directamente para potenciar su actividad a través de plegamientos de la hebra de cromatina o *loops*, que se cree se encuentran estabilizados topológicamente por las proteínas que definen los dominios.

En contraposición a la teoría inicial de que los receptores LXR se encuentran siempre unidos a la secuencia que reconocen en el genoma en el momento en que reciben el tratamiento con el ligando, estos estudios recientes han revelado una serie de matices que indican que de hecho los receptores LXR ocupan una minoría de sitios en el genoma cuando no se encuentra el ligando unidos a ellos. Sin embargo, tras su activación el reclutamiento de los receptores a sitios reguladores de la transcripción aumenta en gran medida, indicando que es el ligando el que promueve la ocupación de las posiciones específicas de LXR en el genoma (Heinz et al., 2010) (Ghisletti et al., 2010). Esto ha sido demostrado también en hepatocitos murinos tratados con el ligando sintético de LXR T0901317 (Boergesen et al., 2012).

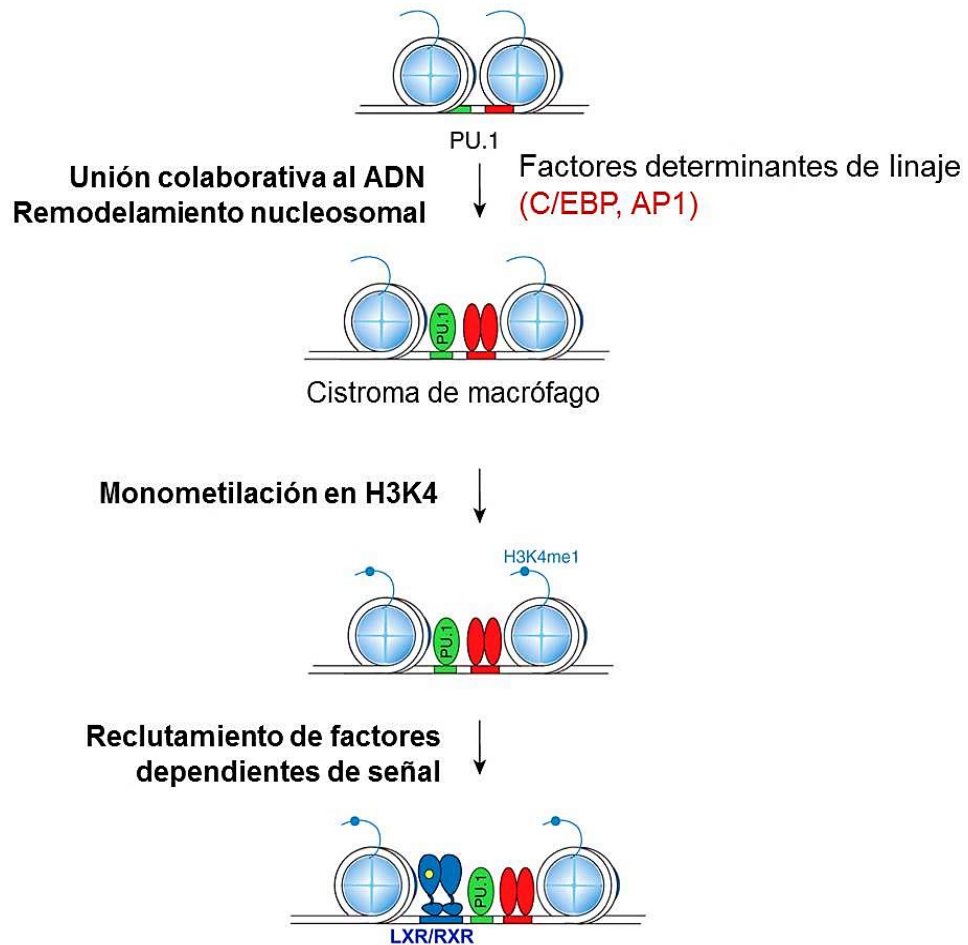


Figura 11. Esquema de la secuencia de eventos que tienen lugar en la determinación de *enhancers* específicos de linaje celular. La unión inicial del factor de transcripción PU.1 en colaboración con otros factores determinantes de linaje, como C/EBP o AP1 en el caso de macrófagos, desencadena la atracción de complejos remodeladores de la cromatina que descubren secuencias de unión en el ADN. A continuación, enzimas metilasas modifican los residuos de las histonas H3 adyacentes con monometilación de la lisina 4 (H3K4me1), marcando así la posición de *enhancers* específicos de tejido con alta accesibilidad para la unión de otros factores de transcripción dependientes de linaje y de señal, como el heterodímero LXR/RXR. Adaptado de Heinz et al., 2010.

En conclusión, las secuencias *enhancer* condicionan los programas de expresión génica propios de cada tejido: la coordinación de las distintas funciones de los ligandos específicos, los elementos pioneros como los factores de transcripción determinantes de linaje, proteínas correguladoras y modificaciones postraduccionales son fundamentales en la especificación de los sitios de unión de los receptores LXR en el genoma (cistroma), lo que ha podido comprobarse en experimentos *in vivo* en hepatocitos murinos (Boergesen et al., 2012) y macrófagos murinos (Heinz et al., 2010) (Ghisletti et al., 2010) (Revisado en Jakobsson et al., 2012).

4. Aplicación de nuevas tecnologías al estudio del genoma.

4.1. Inmunoprecipitación de cromatina seguida de secuenciación masiva (ChIP y ChIP-seq).

La técnica de inmunoprecipitación de cromatina ha revolucionado el estudio del genoma al permitir abordar la cuestión sobre los patrones de unión y localización genómicas de prácticamente cualquier factor de estudio, siempre que se disponga de un anticuerpo específico. Ha aportado una visión global de los elementos que actúan en *cis*, funcionamiento de factores de transcripción y procesos epigenéticos implicados en la regulación de la transcripción génica (Barski et al. 2007). La asociación de esta técnica con los nuevos métodos de secuenciación del genoma, que a su vez han experimentado un gran avance, la convierten en una herramienta de alta resolución muy interesante para el estudio de la regulación del genoma. De hecho, la técnica de ChIP seguida de secuenciación masiva (ChIP-seq) fue una de las primeras aplicaciones de la secuenciación de alto rendimiento (Robertson et al., 2007).

Esta técnica se basa en el enriquecimiento en fragmentos de ADN a los que se encuentra unido un factor de transcripción, o cualquier otra proteína que se asocie con el ADN en un momento determinado, o de modificaciones producidas en las histonas que forman parte de los nucleosomas. Un paso inicial en la técnica consiste en fijar con agentes como el formaldehído todos los elementos en la cromatina, asegurando la inmovilización en un momento representativo del proceso que se quiere estudiar. A continuación se rompe la cromatina, generalmente por sonicación, para conseguir fragmentos pequeños de en torno a 200-400 pares de bases. La cromatina cede allí donde su secuencia no se encuentra protegida por ninguna proteína y su organización es menos compacta. La selección de las secuencias de ADN unidas a elementos de interés a nivel genómico se realiza en este punto con anticuerpos específicos para el elemento, no siendo válido generalmente cualquier tipo de anticuerpo que se usaría para otra técnica. La precipitación de estos fragmentos con esferas que unen la fracción constante del anticuerpo y la purificación posterior del ADN permiten recuperar las secuencias representativas de unión. El siguiente paso será la secuenciación, alineamiento con el genoma de referencia y visualización de las localizaciones de interés.

Como cualquier otra técnica, no está exenta de errores y desventajas, pero la técnica de ChIP ofrece una gran resolución del posicionamiento de la unión de moléculas importantes para la transcripción al genoma, cuenta con una baja inespecificidad en la unión y aunque la secuenciación posterior pueda sufrir sesgo o errores de inexactitud se trata de una técnica muy válida para lograr un mayor entendimiento del funcionamiento del genoma (Kidder et al., 2011).

4.2. Secuenciación de última generación (NGS, *Next Generation Sequencing*).

El desarrollo de nuevas tecnologías de secuenciación en los últimos años ha permitido conocer con gran profundidad los genomas, facilitando el acceso a la información referente a las localizaciones de unión de factores de transcripción, perfil epigenético y organización en general. La “secuenciación de alto rendimiento” o *high-throughput sequencing*, más conocida como “secuenciación de última generación” (NGS, *Next Generation Sequencing*) engloba el conjunto de estas tecnologías modernas de secuenciación de ácidos nucleicos, que ofrecen una alternativa más barata, rápida y de mayor capacidad que la clásica secuenciación de Sanger. Las plataformas de Illumina, Roche, Ion Torrent y SOLiD (Applied Biosystems) son las que actualmente tienen los sistemas más avanzados para ofrecer este tipo de servicios (Park, 2009) (Fig. 12).

Los pasos necesarios para la creación de librerías de ADN previamente a la secuenciación son, salvo detalles técnicos, esencialmente iguales para todas las plataformas (Head et al., 2014):

- Fragmentación de las hebras de ADN a un tamaño adecuado: incluso para muestras derivadas de experimentos de ChIP es un paso necesario, aunque esta técnica ya incluye un paso de fragmentación por sonicación. Los métodos que se pueden emplear para la fragmentación son nebulización, sonicación, paso a través de una aguja de bajo calibre, fragmentación acústica y digestión enzimática entre otras.
- Reparación de extremos (*end repair*): el resultado de la fragmentación en el paso anterior desemboca en que los fragmentos no quedan con extremos romos y homogéneos, sino biselados, exponiendo bases sueltas que pueden hibridar con otros fragmentos, causando agregación. Incluso para la creación de algunas librerías con las plataformas Illumina y Roche se requieren modificaciones posteriores que consisten en: adición de una cadena de monofosfato de desoxiadenosina (dAMP) en los extremos 3', paso llamado *dA-tailing*, que se realiza posteriormente a la reparación de los extremos y fosforilación en el extremo 5'. Illumina también ofrece una variante en este punto, que consiste en la fragmentación y ligación en un solo paso, lo que se denomina “*tagmentation*”.
- Ligación de oligonucleótidos adaptadores a los extremos de los fragmentos de ADN: los adaptadores incluyen secuencias que dan identidad a cada extremo de los fragmentos a los que van unidos. Además, incluyen una parte desde donde se iniciará la secuenciación.

- Amplificación por PCR: los fragmentos de ADN se amplifican con oligonucleótidos específicos para los adaptadores de los extremos. Es muy importante que no se amplifique en exceso, ya que podría ocasionar un sesgo o redundancia en los fragmentos. Es por ello que se lleva a cabo una amplificación de bajo número de ciclos. En el caso de Illumina, la muestra se carga en unas celdas de flujo donde se han fijado los oligonucleótidos complementarios a cada adaptador y la amplificación es de tipo “puente”, en la que la hebra se dobla tras cada ciclo de amplificación y se inicia otro ciclo desde el otro extremo.
- Secuenciación: en el caso de Illumina y Roche las hebras amplificadas se inmovilizan en láminas con celdas o esferas y se inicia la amplificación de las hebras con nucleótidos fluorescentes simultáneamente en todas las celdas, es lo que se llama secuenciación por síntesis. Primeramente se une un oligonucleótido específico a una secuencia incluida en el adaptador, que será elongado incorporando nucleótidos fluorescentes que compiten por la unión correcta en la secuencia. La excitación de las celdas con luz ocasiona que cada vez que un nucleótido es incorporado correctamente se produzca una señal lumínica que es detectada y almacenada. El espectro de emisión y la intensidad de la señal se utilizan para identificar la base incorporada (*base calling*). El número de ciclos va a determinar la longitud de los fragmentos que van a ser secuenciados (llamados *reads*). Un gran avance que ha mejorado la fiabilidad de esta técnica es realizar la secuenciación de forma pareada, es decir, desde ambos extremos, de modo que se aumenta la posibilidad de identificar errores porque cada hebra se secuencia doblemente. Es lo que se conoce como *paired-end sequencing* (PE), en contraposición a *single read* (SR). El método de secuenciación de Ion Torrent es parecido, pero en lugar de hacer uso de señales ópticas, detecta los protones liberados tras la adición de cada nucleótido nuevo.
- Alineación con un genoma de referencia: los resultados de la secuenciación de las hebras se alinean con el genoma que correspondan con la ayuda de herramientas bioinformáticas. Brevemente, los datos originados por la secuenciación llamados archivos *sra* (*Sequence Read Archive*), deben transformarse en formato *fastq* para alinear la información a cualquiera de las versiones del genoma (por ejemplo en ratón la más reciente es mm10), con la herramienta Bowtie. Se origina un fichero *BAM* o *SAM* (*Binary Alignment/Map format* o *Sequence Alignment/Map format*), son iguales excepto en si el fichero está comprimido o no, respectivamente. A partir de éste punto existen diferentes herramientas informáticas y programas que pueden usarse para procesar la información obtenida por secuenciación, para su visualización con la interfaz gráfica *Genome Browser*. Ejemplos de estos programas gratuitos de análisis son *Homer* y *Galaxy*, con los que se transforma el fichero a formato *bedgraph*, el cual se usa para localizar la posición en el genoma de las regiones enriquecidas por ChIP, representadas como vértices o picos sobre la secuencia de ADN. Asimismo, se puede hacer uso de la herramienta MACS para este paso.

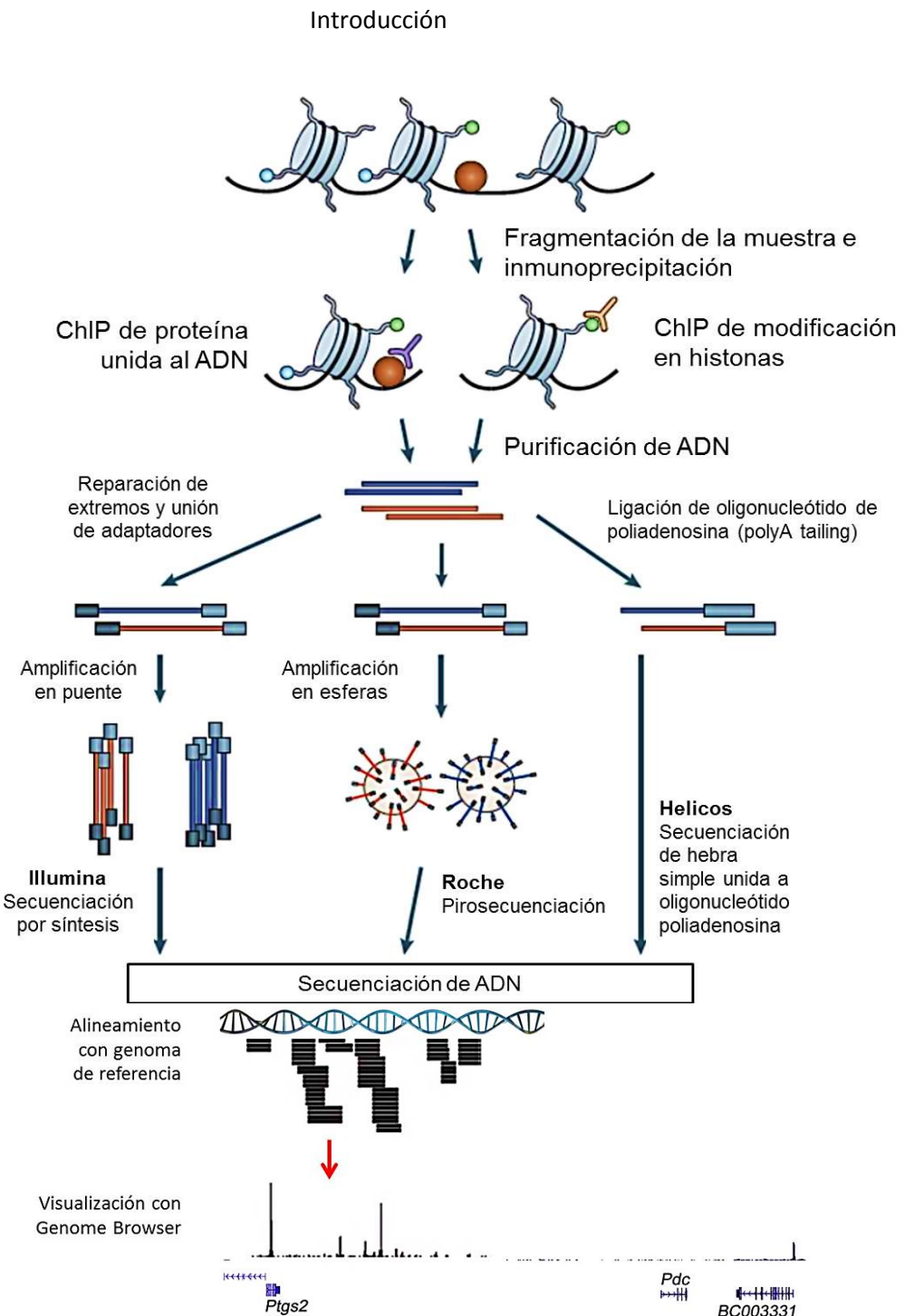


Figura 12. Esquema de la técnica de ChIP seguida de secuenciación de última generación con diferentes plataformas. La técnica de ChIP (inmunoprecipitación de cromatina) seguida de la secuenciación de los fragmentos enriquecidos con un anticuerpo específico, permite conocer los sitios de unión de proteínas asociadas a secuencias concretas en el genoma como los factores de transcripción, así como modificaciones sobre las histonas. El concepto básico en el que se basan las plataformas de secuenciación es el mismo: la amplificación en paralelo de varios fragmentos de ADN se realiza con unos adaptadores unidos a sus extremos. La adición de cada nucleótido fluorescente a la hebra nascente es detectada por un sistema de imagen de alta resolución. La superficie sobre la que se inmovilizan las hebras de ADN originales varía desde láminas de cristal (Illumina, Helicos) a esferas (Roche). La plataforma Helicos utiliza una de las hebras unida a oligonucleótidos de poliadenosina como molde para la síntesis, que se realiza de forma asincrónica entre hebras. Adaptado de Park, 2009.

4.3. Edición del genoma con la tecnología CRISPR.

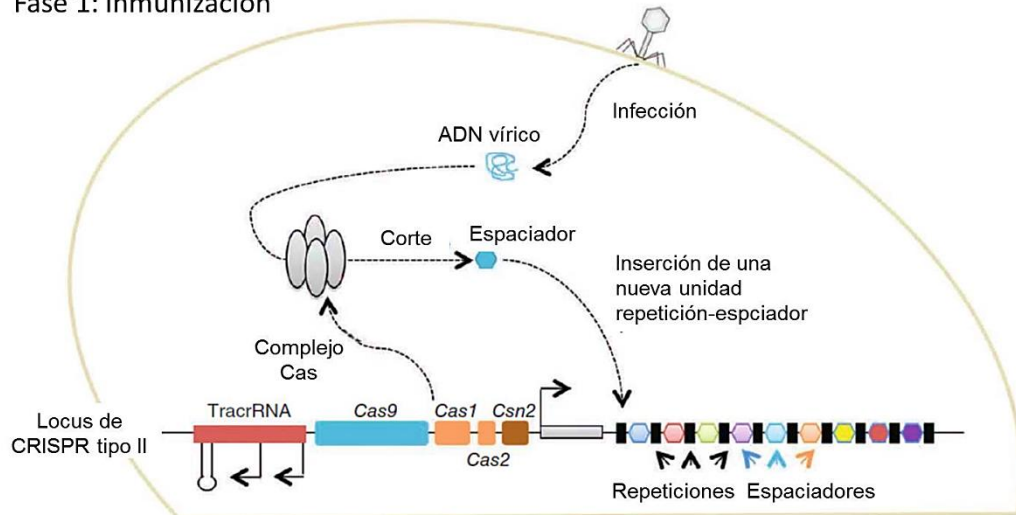
CRISPR (*Clustered Regularly-Interspaced Short Palindromic Repeats*) representa una familia de repeticiones de ADN que se encuentran en el 90% de las especies de arqueas y en un 40% de los genomas de bacteria. Aunque su descubrimiento fortuito se produjo en 1987 (Ishino et al., 1987), el término se acuñó años más tarde, tras la observación por el científico español Francisco Mojica y sus colaboradores de la presencia de estas secuencias en diversas especies bacterianas (Mojica et al., 1993) (Mojica et al., 2000) (Jansen et al. 2002). No fue hasta 2007 cuando se sugirió que el conjunto de secuencias de CRISPR podría tener la función de sistema inmunitario bacteriano (Barrangou et al., 2007). En 2012 la colaboración entre los laboratorios de Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna permitió caracterizar el mecanismo de actuación del sistema CRISPR, proponiéndose por primera vez la posibilidad de ser utilizado como una herramienta para editar genomas (Jinek et al., 2012).

4.3.1. Descripción del sistema CRISPR.

Típicamente, el *loci* de CRISPR consiste en varias repeticiones directas separadas por fragmentos de ADN de secuencia variable llamados espaciadores, que no son sino fracciones de secuencias del material genético de bacteriófagos (incluyendo plásmidos). Frecuentemente se localizan adyacentes a genes *cas* (*CRISPR-associated*), que codifican una vasta y heterogénea familia de proteínas que portan dominios funcionales típicos de nucleasas, helicasas, polimerasas y proteínas de unión a ARN (Horvath y Barrangou, 2010). Existen tres mecanismos de actuación, dependiendo de las características de sus componentes, pero el tipo II es el que más se ha estudiado, particularmente en la especie de *Streptococcus pyogenes*. En este caso, tras una infección vírica su material genético es fraccionado e incorporado en el *locus* de CRISPR bacteriano, manteniéndose separados los fragmentos por secuencias cortas repetitivas. La transcripción total de este *locus* lleva a la producción de una larga hebra de ARN, conocida como pre-crRNA. El procesamiento de esta hebra en el sistema de CRISPR tipo II depende de la unión de otro ARN complementario a las secuencias repetidas del pre-crRNA (es el tracrRNA), codificado en una región distinta del locus CRISPR. Es fundamental el reconocimiento y la hibridación del tracrRNA al pre-crRNA para dirigir la formación del complejo con la proteína Cas9. Este complejo se procesará con la ARNasa III que corta la hebra hibridada, liberando complejos de ribonucleoproteína portando secuencias individuales de espaciadores (Mali et al., 2013) (Fig. 13).

En caso de sufrir una segunda infección por el mismo virus, la bacteria se beneficia de la información genética almacenada en el sistema CRISPR para reconocer las secuencias de ADN invasoras (proto-espaciadores), lo cual en el sistema CRISPR tipo II es posible realizarse siempre que la secuencia nueva tenga un motivo que es identificado por el complejo Cas9. Este motivo se denomina PAM (*Protospacer Adjacent Motif*, motivo adyacente al proto-espaciador), que será reconocida dependiendo de cada especie bacteriana, en el caso de *S. pyogenes* es NGG, siendo N un nucleótido cualquiera (Makarova et al., 2011). Durante la destrucción de la secuencia diana intervienen los dominios nucleasa de la proteína Cas9: HNH y el dominio similar a RuvC, que cortan cada hebra del ADN invasor, generando roturas de doble cadena (DSB, *double strand breaks*).

Fase 1: inmunización



Fase 2: inmunidad

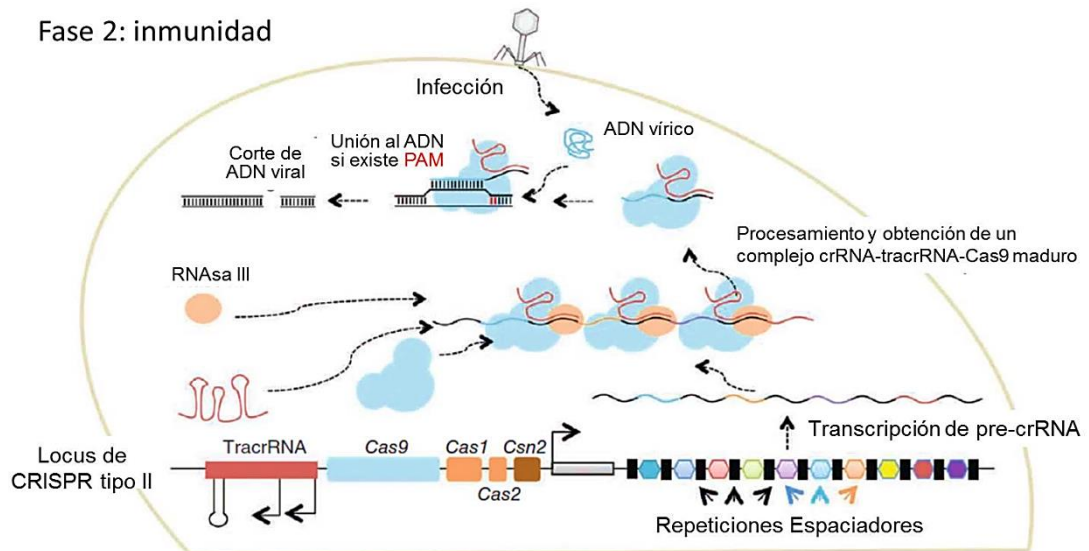


Figura 13. Funcionamiento del sistema CRISPR tipo II en bacterias. En una primera fase de inmunización el sistema CRISPR acumula fragmentos de ADN invasor proveniente de infecciones víricas en el *locus* CRISPR (espaciadores) separados por cortos fragmentos de secuencias repetitivas. En una segunda fase de infección la bacteria utiliza la información genética adquirida para defenderse de infecciones, transcribiendo el locus CRISPR en una larga hebra de ARN (pre-crRNA) que será procesada con la ayuda de las proteínas Cas9 y RNasa III. Primero el tracrRNA acoplado a Cas9 dirige la hibridación del complejo al pre-crRNA en las secuencias repetitivas. Seguidamente, la RNasa III corta la hebra hibridada y finalmente, para producir un complejo maduro se escinde el extremo 5' del espaciador. El complejo formado es capaz de destruir por corte una secuencia complementaria al espaciador (lo que sería el proto-espaciador) sólo si existe adyacente una secuencia PAM reconocida específicamente por cada especie bacteriana. Adaptado de Mali et al., 2013.

Nadie se había percatado del potencial que encerraba este sistema para su aplicación a la modificación del genoma en células eucarióticas, hasta que en 2012 los laboratorios de Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna estudiaron en profundidad el mecanismo de acción del complejo, proponiendo que una programación adecuada del sistema, a través de un diseño del crRNA conveniente según el objetivo génico, podría llevar a su aplicación en la modificación de genomas (Jinek et al., 2012). De hecho, presentaron la primera mejora de las que surgirían en adelante para simplificar aún más el manejo de esta técnica, utilizando un único transcrito quimera que fusionaba en un solo elemento crRNA y tracrRNA en lo que se denominaría ARN guía (gRNA, *guide RNA*; también sgRNA, *single guide RNA*) para localizar el complejo en la posición genómica elegida (Jinek et al., 2012).

En los últimos años la tecnología CRISPR se ha ido refinando para llegar a convertirse en la herramienta más poderosa para la edición génica en células eucariotas. Lograr introducir estos cambios en el genoma está supeditado al funcionamiento de la maquinaria de reparación celular que se desencadena ante una rotura de la doble hebra de ADN: la recombinación no homóloga (NHEJ, *Non-Homologous End Joining*) y la recombinación homóloga (HDR, *Homologous Directed Repair*). El primer mecanismo de reparación implica la unión de la hebra seccionada de forma rápida y poco precisa, introduciendo nucleótidos al azar, es la vía elegida por defecto por la célula dada la gravedad de la lesión. Como consecuencia, se originan mutaciones de tipo *indel* (inserciones y deleciones) en el área de rotura, alterando la secuencia de ADN original (Fig. 14). El segundo mecanismo implica la utilización de otra hebra homóloga, siempre que se encuentre cercana, como molde para introducir los nucleótidos que repararán la rotura, lo cual no altera la secuencia original de la hebra. Por tanto, la interrupción de la secuencia codificante de un gen mediante mutaciones *indel* ocasionará la pérdida del marco de lectura y convertirá a la célula en un mutante *knockout*. De hecho, la tecnología CRISPR se está usando actualmente sobre organismos multicelulares, inyectando los elementos de CRISPR ensamblados en ribonucleoproteínas en embriones, lo que ha acortado significativamente el tiempo de obtención de animales *knockout* para genes concretos. De la misma forma, pueden interrumpirse otras regiones como secuencias reguladoras de genes (Lopes et al., 2016) (Thomas et al., 2016). La vía de reparación por recombinación homóloga, por su parte, permite sustituir una secuencia por otra de interés que tiene que proporcionarse a la célula. Ello posibilita introducir alteraciones controladas en la secuencia de sustitución, e incluso añadir secuencias nuevas al genoma original, como genes reporteros. Incluso, es posible hacer todos estos cambios en varios sitios al mismo tiempo, lo que se conoce como *multiplexing* (Cong et al., 2013).

Dado que la vía de reparación NHEJ es utilizada preferentemente por la célula frente a la HDR, esta cuenta con un bajo porcentaje de eficiencia (en torno al 5%), lo que puede tratar de contrarrestarse administrando a la célula la molécula Scr7, que se sabe que inhibe la ligasa IV, componente clave en la vía de reparación NHEJ (Srivastava et al., 2012).

4.3.2. Mejoras aplicadas al sistema CRISPR.

Como ya se ha comentado previamente, el diseño de un solo transcrito que combinaba las funciones de crRNA y tracrRNA simplificó mucho el manejo de la técnica de CRISPR, pero después de esta se sucedieron otras muchas modificaciones que han convertido esta técnica en una de las más versátiles y precisas en su función.

El grupo de Feng Zhang es uno de los pioneros en la aplicación de la biotecnología a la herramienta CRISPR. Diseñaron una variante de la proteína Cas9 con una sustitución del aspártico 10 a alanina (D10A) en el dominio similar a RuvC, que media uno de los cortes en la doble hebra de ADN. De esta manera se consiguió una proteína Cas9 que no es capaz de cortar las dos hebras, sino sólo una de ellas, formando una mella o *nick*, por lo que la denominaron *nickase* (Cas9n) (Cong et al., 2013). La ventaja de utilizar esta proteína es que la técnica es mucho más precisa, ya que se necesitan dos Cas9n actuando coordinadamente para lograr un corte efectivo, cada Cas9n debe reconocer un motivo PAM en cada hebra. De este modo, si una Cas9n reconociera un sitio inespecíficamente y se produjera un corte, sólo si hubiera otra unión inespecífica lo suficientemente cerca causaría un efecto, en caso contrario, la mella sería reparada sin mayores consecuencias. Puede afirmarse que el 100% de los cortes realizados por Cas9n se producirán en la secuencia diana deseada, lo que la convierte en una herramienta muy atractiva para su uso, así como fiable.

Finalmente un tipo de Cas9 ha sido diseñada no con el objetivo de cortar el ADN, sino de identificar y unirse a secuencias determinadas en el genoma, obteniéndose una ventaja de la gran precisión con la que se pueden dirigir estas proteínas a secuencias específicas. Se trata de una proteína Cas9 con mutaciones en ambos dominios de corte, lo que las inactiva totalmente para esta función, conservando sin embargo la capacidad de reconocimiento de secuencia. Se denominó dCas9 (*dead Cas9*) y ofrece un amplio abanico de aplicaciones como la visualización y el estudio de secuencias repetitivas, por ejemplo en regiones teloméricas (Chen et al., 2013), el silenciamiento génico a través de la interferencia con el avance de la polimerasa II (lo que se ha llamado CRISPRi, CRISPR de interferencia) (Qi et al., 2013) (Gilbert et al., 2013), inducción de la expresión génica mediante el acoplamiento de dCas9 a un activador transcripcional (VP16, proteína viral de *Herpes Simplex*) y dirigiéndola cerca del TSS (Gilbert et al., 2013), incluso se han diseñado dCas9 acopladas a enzimas que producen modificaciones postraduccionales como las metiltransferasas (Liu et al., 2016) o a dominios catalíticos de coactivadores como p300, que transfieren residuos acetilo en la lisina 27 de la histona H3 (H3K27) (Hilton et al., 2015) (Revisado en Komor et al., 2017).

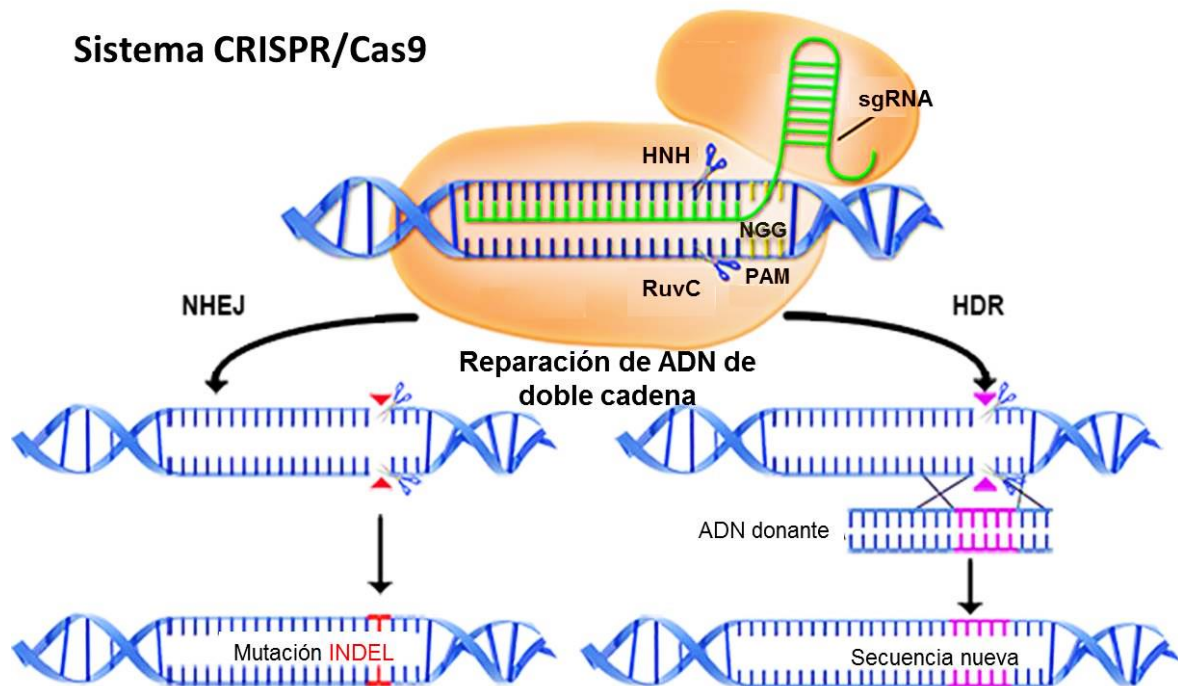


Figura 14. Esquema del funcionamiento del sistema CRISPR en células eucarióticas. El sistema CRISPR se aplica actualmente con éxito para la modificación de secuencias en genomas eucarióticos, basándose en la maquinaria de reparación de la cadena de ADN de la célula. El corte en la hebra de ADN, producido por el dominio HNH y el dominio similar a RuvC de la proteína Cas9, es reparado mediante uno de los dos mecanismos de reparación con los que cuenta la célula: recombinación no homóloga (NHEJ, *Non-Homologous End Joining*) o recombinación homóloga (HDR, *Homologous Directed Repair*), los cuales conllevan distintas consecuencias. El primer mecanismo implica la introducción de nucleótidos al azar en los extremos seccionados, lo que origina mutaciones de tipo *indel* (inserciones y delecciones) que alteran la secuencia genómica y puede ocasionar la pérdida de la funcionalidad de esa secuencia. El segundo mecanismo consiste en una reparación que depende de la secuencia de una hebra molde, lo cual resulta ventajoso para introducir en el genoma una secuencia nueva, siempre que se proporcione a la célula, diseñada con unos extremos idénticos a los que flanquean la rotura.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- Generación de un modelo celular de macrófagos murinos inmortalizados para estudiar la actividad transcripcional de LXR α y LXR β de manera individualizada.
- Estudio del perfil transcripcional de LXR α y LXR β en genoma completo mediante tecnología de microarrays en macrófagos murinos inmortalizados.
- Análisis bioinformático de los procesos celulares y las rutas de señalización en los que están implicados los genes cuya expresión de ARN se encuentra regulada por los receptores LXR α y LXR β .
- Identificación de nuevos genes diana de los receptores LXR α y LXR β implicados en funciones relevantes para la biología del macrófago.
- Optimización y empleo de la técnica de inmunoprecipitación de cromatina asociada a LXR α y LXR β para estudiar el patrón de unión genómico de estos receptores nucleares en la cercanía de potenciales nuevos genes diana de LXR en macrófagos.
- Empleo de la técnica de inmunoprecipitación de cromatina para el análisis de los cambios en la localización y extensión genómica de la marca de acetilación en la lisina 27 de la histona H3 (H3K27Ac), asociada con la transcripción génica activa, en respuesta al tratamiento con un agonista y antagonista sintéticos.
- Empleo de nuevas técnicas de edición genómica (CRISPR) para la identificación y estudio de la funcionalidad de regiones reguladoras de genes diana de LXR.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales de experimentación.

Se emplearon cepas de ratones con fondo mixto C57BL6/Sv129, de los siguientes genotipos:

- Wild type (WT): cepa salvaje.
- $LXR\alpha^{-/-}$ *knockout* ($LXR\alpha$ KO): carentes del gen Nr1h3 ($LXR\alpha$).
- $LXR\beta^{-/-}$ *knockout* ($LXR\beta$ KO): carentes del gen Nr1h2 ($LXR\beta$).
- Doble *knockout* $LXR\alpha\beta^{-/-}$ (LXR DKO): carentes de ambos genes para LXR.

Los ratones de experimentación fueron proporcionados por David Mangelsdorf (Peet et al., 1998).

2. Obtención de macrófagos primarios.

2.1. Obtención de macrófagos peritoneales murinos mediante peritonitis estéril por inyección de tioglicolato.

Para inducir el reclutamiento de macrófagos peritoneales se inyecta en la cavidad peritoneal de ratones 3mL de medio tioglicolato al 3% estéril (BD Difco) a pH7,0 preparado con una antigüedad de al menos un mes. Al cabo de 3 días se sacrifican los ratones por inhalación de isofluorano (Laboratorio Esteve Veterinaria) en una campana de eutanasia y se recogen los macrófagos mediante tres lavados de la cavidad peritoneal con tampón fosfato salino (PBS) estéril. El PBS es inyectado con una jeringa de 10mL y una aguja de 23G (0,6mm x 25mm) (BD Microlance™ 3) consiguiendo un desplazamiento visceral y una mayor eficiencia en la recogida de macrófagos. A continuación la suspensión celular se limpia de restos de tejido pasando a través de un filtro de nylon de 70µm (BD Falcon™), se centrifugan 5 minutos a 1.500 rpm y se resuspenden en medio RPMI 1640® (Biowest) suplementado al 10% con suero bovino fetal (FBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific). Se cuentan los macrófagos en una cámara de Neubauer-improved (Marienfeld) discriminando por tamaño entre las células del lavado peritoneal y se siembran en placas tratadas para cultivo celular en una densidad aproximada de $2,5 \times 10^6$ macrófagos por pocillo en placas multiwell de 6 pocillos (Falcon). Al cabo de una hora se realizan 3 lavados al cultivo con PBS estéril y se cultivan con medio completo fresco durante al menos 8-16 horas

2.2. Obtención de macrófagos murinos derivados de médula ósea (BMDMs).

Tras el sacrificio de un ratón se obtienen los dos fémures y las tibias, se cortan los extremos y se lava el interior con PBS (tampón fosfato salino a pH7,4) empleando una jeringuilla de 10mL y una aguja de 25G (0,5mm x 25mm) (BD Microlance™ 3). Se disgrega el tejido pasándolo por un filtro de nylon de 70µm (BD Falcon™) y se centrifuga 5 minutos a 1.500 rpm. Para lisar los eritrocitos se resuspende el tejido medular con 1mL de solución de lisis de eritrocitos (ACK buffer) estéril que contiene cloruro amónico 150mM, bicarbonato potásico 10mM y EDTA 10mM a pH7,4. Esta solución se deja actuar durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se contrarresta la alta concentración en sales de la solución de lisis con una dilución 1:10 con PBS y se vuelve a pasar todo el volumen por un filtro de nylon de 70µm antes de centrifugar 5 minutos a 1.500 rpm. Finalmente se siembran las células en 4 placas no adherentes de tipo Petri (VWR), con 7mL de medio de diferenciación que contiene: 70% DMEM® (Lonza) y 30% de sobrenadante concentrado proveniente de las células L929, productoras de la citoquina M-CSF (CSF1). Las células se cultivan durante 7 días permitiendo su correcta diferenciación y después se recogen, haciendo un lavado previamente con PBS, con 5mL de PBS-EDTA 10mM por placa, lo que va a debilitar las uniones celulares al plástico de la placa. Se deja actuar durante 2 ó 3 minutos en el incubador antes de recoger las células y seguidamente se contrarresta la acción del PBS-EDTA diluyendo el volumen a la mitad con PBS. Se centrifuga 5 minutos a 1.500 rpm, se resuspenden en 10mL de medio de cultivo y se cuentan con colorante vital Azul Tripán (Sigma) antes de sembrar el número deseado de células para el experimento. Para ello se siembran en placas de cultivo tratadas con medio fresco de diferenciación.

3. Cultivo de células.

3.1. Cultivos primarios. Cultivo de líneas celulares.

Todas las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire en un incubador MCO-18AIC CytoGROW GLP series (Sanyo). Los medios de cultivo empleados fueron RPMI 1640® o DMEM® suplementados con 10% de suero bovino fetal (FBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific) y antibióticos penicilina (100U/mL) (Sigma) y estreptomicina (100µg/mL) (Sigma). Todas las células fueron observadas bajo el microscopio óptico Olympus CKX41 con los aumentos de 10x y 20x.

Para los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina se utilizaron también, además de macrófagos, fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) inmortales carentes de expresión de proteínas LXR (DKO) o que expresan la proteína LXRα. Para experimentos western blot y qPCR se utilizó la línea de RAW 264.7 que expresa LXRα murino, generada también en nuestro laboratorio.

3.2. Tratamientos farmacológicos *in vitro*.

Los tratamientos farmacológicos que se emplearon en las células con los siguientes compuestos sintéticos se resumen en: el agonista GW3965 (GSK) a una concentración final de 1 μ M, el antagonista GSK1440233A (GW233) (Zuercher et al., 2010) a una concentración final de 2 μ M y el agonista específico de RXR: LG100268 (LG268) (Ligand Pharmaceuticals) a una concentración final de 0,2 μ M en combinación con el agonista sintéticos de LXR, todos ellos preparados en solución stock de DMSO (Sigma). La preparación del antagonista de LXR requiere una dilución intermedia 1:10 con PBS o medio de cultivo, debido a su baja solubilidad en medios acuosos.

Junto con la adición de los tratamientos farmacológicos los cultivos celulares fueron sometidos a condiciones de serodepresión (este régimen de cultivo está encaminado a reducir lo más posible la contribución endógena de ligandos naturales presentes en el suero) con 0,5% de FBS en medio DMEM® o RPMI 1640® y 1% de la mezcla de antibióticos.

En aquellos experimentos en los que se incluyó en el cultivo el antagonista de LXR (GW233) las condiciones de serodepresión se lograron con medio bajo en ácidos grasos: DMEM® sin suero suplementado con 0,2% de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma), 1% de la mezcla de antibióticos y ácido zaragócico a 2 μ M (Sigma) durante al menos 4 horas previamente a la adición de los tratamientos sintéticos. El ácido zaragócico es un potente inhibidor de origen fúngico de la enzima escualeno sintasa, la cual cataliza la síntesis de escualeno, que es el precursor químico de los esteroides. Su adición al medio de serodepresión produce una reducción en los niveles celulares basales de esteroides endógenos, los cuales constituyen una fuente de ligando del receptor LXR. Además, como consecuencia de esta depleción se desencadenará un aumento en los niveles de expresión del receptor de colesterol LDL en la superficie celular, que será detectado en experimentos de western blot.

4. Generación de líneas de macrófago inmortalizadas que expresan LXR α o LXR β .

4.1. Inmortalización de macrófagos murinos obtenidos de médula ósea mediante el sistema retroviral J2.

La inmortalización de macrófagos se realizó a través de la infección con un retrovirus denominado J2, portador de dos oncogenes murinos: v-myc y v-raf (Blasi et al., 1985) (Blasi et al., 1987). Se mantiene la línea celular J2 en medio de cultivo completo (DMEM® 10% FBS y 1% de penicilina y estreptomycin) hasta que alcanza la confluencia y después se mantienen 48 horas más antes de recoger el medio, el cual se filtra con un filtro de 45 μ m de diámetro de poro. El medio resultante que contiene el retrovirus puede usarse inmediatamente o congelarse a -80°C.

Se extrae la médula ósea de ratones LXR DKO, que no expresan ninguno de los receptores LXR, y se cultiva 24 horas en 10mL de medio de cultivo que contiene: 85% de sobrenadante J2 filtrado, 5% de FBS, bromuro de hexadimetrina (Polybrene®, Sigma H9268) a una concentración de 10µg/mL y 10% de medio condicionado GM-CSF proveniente del hibridoma BHK-HM5 el cual es recolectado 48 horas tras alcanzar el cultivo la confluencia. El cultivo de la médula proveniente de cada ratón (dos fémures y dos tibias) se realiza en cuatro placas de cultivo tratadas de 100mm de diámetro.

Tras 24 horas se retiran las células que no se han adherido a las placas y se resiembran con medio de cultivo que contiene: 20% de sobrenadante J2 filtrado, Polybrene® a una concentración de 10µg/mL, 15% de medio condicionado GM-CSF y 65% de medio completo DMEM®.

Se incuban las células durante siete días y tras ese tiempo se subcultivan y se dividen 1:2 en placas de cultivo de 100mm de diámetro.

En este punto los macrófagos inmortalizados adquieren la capacidad de dividirse por sí solos y van formando agrupaciones de proliferación continuada. De este modo se crea la línea control LXR DKO que se somete a estudio posterior. Si bien la generación de líneas parentales inmortales también se ha logrado en el laboratorio empleando M-CSF como citoquina de diferenciación y el sistema J2, Los experimentos presentados en esta tesis doctoral corresponden a las líneas inmortales creadas con la citoquina GM-CSF.

4.2. Infección de las líneas de macrófago inmortalizadas con retrovirus portadores del plásmido con LXR α o LXR β – sistema celular Phoenix.

Se empleó el sistema celular Phoenix A, que es una línea celular de segunda generación productora de retrovirus anfotrópicos. Proviene de las células 293T humanas modificadas, son altamente transfectables y cuentan con una maquinaria molecular capaz empaquetar los plásmidos que se le introducen en cápsides retrovirales. Dichas cápsides se producen listas para transfectar muy eficientemente y de forma estable material genético en células de mamífero en activa división.

Se transfectó en las células Phoenix A con el plásmido pBabe que porta dos genes de resistencia a antibióticos: ampicilina y puomicina y el ADNc humano LXR α o LXR β creados con una cola polipeptídica de 3 repeticiones de la secuencia FLAG (3FLAG-LXR α o 3FLAG-LXR β). Para ello se transfectaron 10µg de plásmido con Lipofectamina 2000® (Thermo Fisher Scientific) en proporción 1:1,5 en medio Opti-MEM® (Gibco, Thermo Fisher Scientific) y se incubó durante 6 horas antes de sustituir el Opti-MEM® por medio de cultivo completo DMEM® con 10% de FBS. Tras 48 horas se recolecta el sobrenadante con las cápsides víricas y se pasa a través de un filtro de 45µm de diámetro de poro. Antes de poner en contacto el sobrenadante filtrado con el cultivo se añade Polybrene® a una concentración de 10µg/mL para aumentar la absorción del material viral por parte de las células.

La infección se planifica cuando el cultivo de macrófagos inmortalizados se encuentra en torno al 50% de confluencia y después se cultiva durante 24 horas. Al día siguiente se retira el medio de infección y se añade medio fresco con 10% de medio condicionado GM-CSF y se incuban las células 48 horas. Durante los días siguientes se supervisa la recuperación de la tasa normal de crecimiento de las células antes de proceder a la selección de los clones con puomicina (Sigma). Para ello las células se subcultivan en placas de 150mm de diámetro. Se incluye en el medio de cultivo concentraciones crecientes de puomicina, empezando en 2,5µg/mL y aumentando la dosis cada dos días hasta 10µg/mL. Las líneas celulares se obtienen a partir de las colonias que sobreviven tras el tratamiento, y se pueden subcultivar en conjunto, manteniéndose como una población celular heterogénea o seleccionar clones aislados.

Para la generación de la línea celular que expresa LXRα murino a partir de la línea celular RAW 264.7 se sigue el procedimiento previamente descrito (Venkateswaran et al., 2000).

5. Citometría de flujo.

El fenotipo de las células inmortalizadas LXR DKO fue analizado con el citómetro separador (cell sorter) SH800S de la marca Sony.

Los anticuerpos empleados para el estudio del fenotipo fueron:

Proteína diana	Reactividad	Origen	Marcaje fluorescente	Casa comercial
CD11b	Ratón	Rata	PerCP-Cy5.5	Biolegend (clon M1/70)
F4/80	Ratón	Rata	PE o FITC	Immunostep (clon BM8)
CD68	Ratón	Rata	PE o FITC	Bio-Rad (clon FA-11)
TLR4	Ratón	Rata	PE	BD Pharmingen (clon MTS-510)
CSF1R	Ratón	Rata	APC	eBioscience (clon AFS98)
Ly6C	Ratón	Rata	PE-Cy7	BD Pharmingen (clon AL21)
TIM4	Ratón	Rata	PE	eBioscience (clon RMT4-54)

6. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) y western blot.

Los extractos de proteínas celulares totales se obtuvieron con solución RIPA, originariamente descrita para radioinmunoprecipitación (Tris-HCl 10mM pH7,5, NaCl 150mM, Tritón X100 1%, desoxicolato sódico 0,5% y SDS 0,1%) (Greenfield, 2014) suplementado con inhibidor de proteasas Complete® (Roche). Tras 15 minutos en hielo los extractos fueron centrifugados a 14.000 rpm y los sobrenadantes se cuantificaron con el método BCA (ácido biconínico y solución de sulfato de cobre) (Sigma) empleando el lector de placas Microplate Reader Model 680® (Bio-Rad).

Para los experimentos de electroforesis se utilizaron cantidades entre 20 y 100ug de extracto de proteína total para su resolución en minigeles de poliacrilamida al 8% (acrilamida:bisacrilamida 29:1, Bio-Rad) junto con marcador de pesos moleculares Precision Plus Protein Dual Color® (Bio-Rad). Las proteínas del extracto celular se desnaturalizaron con tampón de carga (SDS 10%, Tris-HCl 0,25M pH6,8; azul de bromofenol 0,1%, glicerol 50%, 2-mercaptoetanol 5%) y se sometieron a un campo eléctrico de 100V para su separación por tamaño, con un tampón de electroforesis compuesto de Tris-base 25mM, glicina 192mM y 0,1% de SDS.

Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (TB Diagnost), previamente activada 1 minuto con metanol 100%, a 300mA durante 90 minutos a 4°C con un tampón de transferencia compuesto de Tris-base 25mM, glicina 192mM, 0,1% de SDS y 20% metanol. Las uniones inespecíficas que se dan por parte del anticuerpo fueron bloqueadas incubando la membrana 30 minutos con Blotto® (Santa Cruz Biotechnology) al 5% con TBS-T (Tris-base 20mM, NaCl 150mM y 0,5% Tween 20, pH7,5) en agitación suave. Las membranas con las proteínas se incubaron con anticuerpo primario diluido en 2,5% Blotto® con TBS-T se incubó durante la noche a 4°C en agitación suave. Al día siguiente se lavó la membrana 3 veces con TBS-T durante 5 minutos cada vez y seguidamente se incubó con el anticuerpo secundario en 2,5% Blotto® con TBS-T, durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación suave. La peroxidasa de rábano (HRP, *horseradish peroxidase*) acoplada al anticuerpo secundario en su fracción constante permite revelar la presencia de proteína a la que se ha unido el anticuerpo primario, cuando se suministra un sustrato adecuado para su oxidación y consecuente generación de luminiscencia. El sustrato empleado fue Clarity Western ECL substrate® (Bio-Rad) y la luminiscencia se captó con el sistema ChemiDoc XRS® (Bio-Rad).

Las imágenes de las membranas reveladas con el sistema ChemiDoc XRS® se analizaron con el software Image J para determinar la intensidad de las bandas en unidades arbitrarias. Se normalizaron los valores obtenidos a la intensidad de las bandas de β -actina o GAPDH, empleadas como proteínas de control de carga del gel de western blot.

Los anticuerpos empleados en western blot fueron:

Anticuerpos primarios					
Proteína diana	Reactividad	Origen	Clonalidad	Casa comercial	Concentración de uso
ABCA1	Ratón	Conejo	Policlonal	Novus (NB400-105)	1:4000
ABCG1	Ratón	Conejo	Policlonal	Novus (NB400-132)	1:1000
β -actina	Ratón	Ratón	Monoclonal	Santa Cruz (clon C4) (SC-47778)	1:500
FAS	Ratón	Ratón	Monoclonal	BD Biosciences (13/Fatty Acid Synthase)	1:500
FLAG	Péptido sintético	Ratón	Monoclonal	Sigma (clon F3165)	4 μ g/mL
GAPDH	Ratón	Conejo	Policlonal	Sigma (G9545)	1:10.000
LXR α / β	Ratón	Conejo	Policlonal	Cedido amablemente por el Dr. E. Treuter (Instituto Karolinska)	1 μ g/mL
LXR α	Ratón	Ratón	Monoclonal	Abcam (clon PPZ0412)	1 μ g/mL
LDL-R	Ratón	Conejo	Policlonal	Cayman (10007665)	1:1.000
Anticuerpos secundarios acoplados a HRP					
Fc anticuerpo	Ratón	Cabra	Policlonal	Santa Cruz (SC-2005)	1:10.000
Fc anticuerpo	Conejo	Cabra	Policlonal	Santa Cruz (SC-2004)	1:10.000

7. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) y secuenciación (ChIP-seq).

Las células que se dedicaron al estudio del cistroma de LXR (líneas celulares inmortalizadas que expresan LXR α o LXR β humanos unidos al péptido FLAG o células control (LXR DKO) se trataron previamente en condiciones de serodepresión (DMEM 0,5% de FBS) con GW3965 (2 μ M) durante 16h.

Las células que se dedicaron al estudio de las marcas de acetilación (líneas celulares inmortalizadas que expresan LXR α o LXR β humanos) se trataron previamente en condiciones de serodepresión (DMEM 0,2% de BSA y ácido zaragóico 2 μ M) con GW3865 (2 μ M) o GSK2033 (2 μ M) durante 16h.

7.1. Extracción, fijación y sonicado de la cromatina.

Primeramente se someten las células a una fijación en dos pasos. Las células se cuentan y resuspenden en PBS con DSG (di-N-succinimidil glutarato) (Thermo Fisher Scientific) a una concentración final de 2mM. Se distribuyen 2,5 x 10⁷ células por cada mililitro en tubos Eppendorf® de 1,5mL, durante 30 minutos a temperatura ambiente en rotación suave. El DSG es un compuesto fijador que reacciona con las aminas peptídicas a través de dos ésteres N-hidroxisuccinimida (NHS) situados en polos opuestos de la molécula. Cuenta con mayor potencia

que el formaldehído, que se emplea en la fijación tradicional de la cromatina, debido a que el tamaño del brazo espaciador entre los dos ésteres NHS permite crear redes de fijación más extensas y por tanto también une aquellas proteínas indirectamente ancladas al ADN a través de otra proteína, como es el caso de los reguladores de la transcripción (Nowak et al., 2005) (Zeng et al., 2006)

A continuación, se lavan las células con PBS dos veces, aprovechando estos pasos para distribuir aproximadamente $1,25 \times 10^7$ células por cada tubo. El segundo paso de fijación se realiza con formaldehído al 1% en PBS durante 10 minutos. La reacción se detiene añadiendo glicina a cada tubo (concentración final de 200mM) (Sigma).

La lisis de las células se produce también en dos pasos, primero con una solución hipotónica (Tris-HCl 50mM pH8, KCl 85mM, NP-40 0,5%) e inhibidor de proteasas Complete® (Roche) durante 10 minutos a 4°C, lo que liberará los núcleos celulares intactos. Se centrifugan los tubos a 3.000 rpm durante 10 minutos a 4°C con el fin de separar los núcleos celulares del material citoplásmico. El sobrenadante es descartado y se resuspende el material nuclear en solución de lisis (Tris-HCl 50mM pH8, EDTA 10mM, SDS 1%) con inhibidor de proteasas Complete® dejándose en rotación durante 10 minutos a 4°C. Tras ese tiempo es preciso congelar los tubos durante al menos 30 minutos a -80°C.

Para cada inmunoprecipitación se usaron 3 tubos Eppendorf® de cromatina, que se sonicaron con Bioruptor® (Diagenode) en un baño de agua-hielo a máxima potencia durante 60 minutos (30 segundos apagado/ 30 segundos encendido). Se centrifugaron los tubos durante 10 minutos a 14.500 rpm antes de recoger el sobrenadante con la cromatina fragmentada. Para comprobar la eficiencia de la sonicación se tomó un 10% del volumen de sobrenadante de cada tubo (lo que se conoce como *input* o material de partida para la inmunoprecipitación) que es revertido con solución de reversión (SDS 1%, NaHCO₃ 0,1M, 10μL de NaCl 5M, ribonucleasa-A 6μg/mL) durante 30 minutos a 37°C y después se añadió proteinasa K (400μg/mL) (Takara) que se deja actuar durante 1 hora a 55°C. El ADN libre se purifica con el método de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en proporción 25:24:1 (Sigma). La concentración de ADN es determinada con un espectrofotómetro Nanodrop® (ND-1000 Spectrophotometer, Nanodrop Technologies) antes de tomar de 0,6 a 1μg ADN para analizar en un gel de agarosa al 2% con TAE (Tris-base, ácido acético glacial y EDTA) con un marcador de pesos moleculares de ADN de 100 a 1.000 pares de bases (Bio-Rad, EZ Load™ 100 bp Molecular Ruler).

7.2. Inmunoprecipitación y purificación del ADN.

El 90% de cromatina restante se cuantifica con un espectrofotómetro Nanodrop® y así poder igualar las cantidades entre distintos tratamientos, después se mantiene a 4°C hasta la comprobación de su fragmentación. A continuación se diluye con solución de dilución (Tris-HCl 10mM pH8, EDTA 2mM, Triton™ X-100 1%, NaCl 150mM, glicerol 5%) hasta 2mL antes de añadirse el anticuerpo (4μg por tubo de inmunoprecipitación).

Material y métodos

Para la captura de los complejos de anticuerpo unido a los fragmentos de ADN de interés se usaron 100µL de esferas magnéticas Dynabeads® con proteína A (Thermo Fisher Scientific) para cada tubo de inmunoprecipitación, previamente bloqueadas con PBS y BSA 0,5% y se incubó durante 3 horas en rotación suave a 4°C. Seguidamente se lavaron las esferas magnéticas unidas a los fragmentos de cromatina de forma seriada con tres soluciones con concentraciones crecientes de sales (solución I: Tris-HCl 20mM pH8, NaCl 150mM, EDTA 2mM pH8, Triton™ X-100 1%, SDS 0,1%; solución II: Tris-HCl 20mM pH8, NaCl 500mM, EDTA 2mM pH8, Triton™ X-100 1%, SDS 0,1%; solución III: Tris-HCl 10mM pH8, desoxicolato sódico 1%, EDTA 1mM pH8, NP-40 1%, LiCl 250mM) y finalmente dos lavados con solución T.E (Tris-HCl 10mM pH8, EDTA 1mM pH8). Para realizar cada lavado se inmovilizaron las esferas magnéticas con la ayuda de un soporte magnético. Después del último lavado se resuspendieron las esferas unidas a los complejos en 150µL solución de reversión y se deja actuar como previamente se ha descrito. El ADN unido a los complejos proteína-anticuerpo-esfera magnética se purificó con QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen®) y se eluyó en 50µL de tampón de elución caliente del kit.

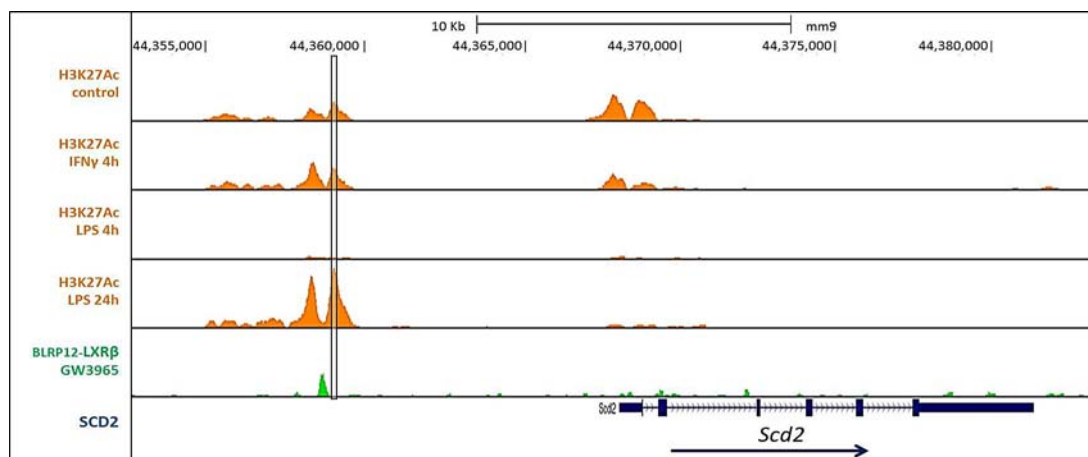
El ADN liberado de las esferas se purificará haciendo pasar por una misma columna del kit cada tubo empleado en la inmunoprecipitación.

Los anticuerpos empleados en las inmunoprecipitaciones fueron:

Anticuerpo	Reactividad	Origen	Clonalidad	Casa comercial
Anti-Péptido FLAG	Sintético	Ratón	Monoclonal	Sigma (clon F3165)
Anti-LXRα/β	Ratón	Conejo	Policlonal	Cedido amablemente por el Dr. E. Treuter (Instituto Karolinska)
Anti-LXRα	Ratón	Ratón	Monoclonal	Abcam (clon PPZ0412)
Anti-RXRα	Ratón	Conejo	Policlonal	Santa Cruz (SC-553)
IgG sérica	Ratón	Ratón	Policlonal	Invitrogen (10500C)
Anti-Acetilación en lisina 27 de la histona H3 (H3K27Ac)	Ratón	Conejo	Policlonal	Abcam (ab4729)

Para la validación de la técnica y el sistema celular una dilución 1:5 del ADN purificado (una dilución 1:10 para *input*) se somete a amplificación por PCR cuantitativa (qPCR). El diseño de cebadores se realizó para regiones genómicas específicas donde se ha publicado previamente la unión de la proteína LXRβ (Heinz et al., 2010) y la extensión de la presencia de marcas de acetilación en la histona H3 (Ostuni et al., 2013). Dicha información es de acceso público en la base de datos de secuenciación GEO (Gene Expression Omnibus). Se relativizó la amplificación por qPCR en estas regiones con la amplificación obtenida en regiones distales e improbables para la unión de LXR como control negativo.

Material y métodos



Ejemplo de la región genómica en el gen *Scd2*, según los datos obtenidos por los estudios de los autores mencionados, donde se aprecia el sitio de unión de LXRβ (en verde) y la presencia de la marca de acetilación en la lisina 27 de la histona H3. Se recuadra la región donde fueron diseñados los cebadores específicos para esta marca.

Los cebadores empleados en la amplificación por qPCR de los fragmentos de ChIP fueron:

ChIP para el estudio del cistroma de LXR		
Gen diana	Secuencia (5'→3') FWD	Secuencia (5'→3') REV
Región distal	GCCTATCATGCATTGTTGGAGT	ACTCAACTGGCAGAAAATGGAC
ABCA1	GCTTTCTGCTGAGTGACTGAACTAC	GAATTACTGGTTTTTGCCGCG
ABCG1	GACAACAGAGCACAGGTGGA	GGGAATTGCCTAATGGGGCT
MYLIP	TCATCTAACGCCGCTAGTAA	ACACTGTAATCTGACACTTAGGC
SCD1	CGGGTGCTGACCGAGAATAA	GTTGAACCCTCAGCCCCAC
SCD2	CAGACGCCTAGAGAGACCTG	ATTGGCTGCGAGGAGTCAG
SREBF1	GAACCAGCGGTGGGAACACAGAGC	GACGGCGGCAGCTCGGGTTTCTC
ChIP para el estudio de la presencia de marcas de acetilación en histona H3 (H3K27Ac)		
Gen diana	Secuencia (5'→3') FWD	Secuencia (5'→3') REV
Región distal	GCCTATCATGCATTGTTGGAGT	ACTCAACTGGCAGAAAATGGAC
ABCA1 (región promotora)	GGCATAAACAGGGAAAGAATGTTC	CGAGTGCGGCAGTTCTGA
MYLIP	CTTAGGTTTGCACTGCTCACA	GCAGCCCAAAATAATCAACCTC
SCD1	CAGATTAAGTACAACGCACCTT	TAAGTCCTATGTAGACTGGCA
SREBF1	CTTAAGCAGGATAAAGAGGCC	CCCTGCACTCTATTACTTTGCC

Los resultados de ChIP se representaron normalizados a los valores de amplificación por qPCR del *input* (% de *input*) o como enriquecimiento de la unión del anticuerpo específico relativo al enriquecimiento obtenido con el anticuerpo de control (inmunoglobulinas séricas de ratón) o alternativamente del anticuerpo específico en el genotipo LXR DKO o en una región genómica improbable para la unión de los receptores LXR.

La secuenciación de los fragmentos específicos de los sitios de unión de las proteínas LXR en el genoma murino se realizó del ADN obtenido de al menos 3 experimentos independientes de ChIP sobre las líneas inmortalizadas (LXR DKO, 3FLAG-LXR α y 3FLAG-LXR β) con el anticuerpo específico FLAG. Para la secuenciación de las regiones genómicas con la presencia de la marca de acetilación en la lisina 27 de la histona H3, la purificación de fragmentos específicos se realizó de 3 tubos por condición, sonicados e inmunoprecipitados a la vez. Se prepararon 20ng de ADN de cada línea y 500ng de *input* del experimento de cistroma de LXR y entre 100 y 160ng totales a 10ng/ μ L de concentración del experimento de inmunoprecipitación de la marca de acetilación. Todas las muestras fueron procesadas en el servicio de genómica del Centro de Regulación Genómica de Barcelona. El material de partida (*input*) se empleó para el alineamiento con el genoma murino en la versión mm10.

7.3. Alineación de los datos de secuenciación obtenidos por ChIP-seq con el genoma murino.

La información proveniente de estudios de secuenciación “de nueva generación” o “masiva” (NGS, *Next-Generation Sequencing*) de los ChIP-seq se encuentra generalmente en servidores públicos con formato comprimido *sra* (*Sequence Read Archive*). Este formato debe convertirse primero a formato *fastq* usando la herramienta “fastq-dump” obtenida en la página web de NCBI SRA Toolkit. Posteriormente se usa otra herramienta, “bowtie2”, para alinear los datos obtenidos de la secuenciación con un genoma murino de referencia (mm10 en nuestro caso). Finalmente con el *software* HOMER (*Hypergeometric Optimization of Motif EnRichment*), una colección de herramientas informáticas para el descubrimiento de motivos y análisis de datos de secuenciación de nueva generación (Heinz et al., 2010) se transforma a formato *bedgraph*. Con este formato se posibilita la visualización gráfica de datos genómicos obtenidos por técnicas como ChIP-seq, Gro-seq y otras con la herramienta UCSC Genome Browser. Los estudios bioinformáticos de ChIP-seq realizados con las líneas celulares aquí descritas fueron realizados por otro compañero de laboratorio y en este caso se emplearon detalles de los lugares genómicos ocupados por LXR α o LXR β de dicho estudio.

8. Extracción de ARN mensajero.

El ARN se extrajo con el reactivo comercial TRIZOL® (MRC) usando 1mL por muestra. Se añade cloroformo en proporción 1:5 respecto al volumen de TRIZOL®, se agita vigorosamente durante 10 segundos y se centrifuga a 14.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo y se añade isopropanol frío en una proporción 1:1. La precipitación se realiza a temperatura ambiente durante 20 minutos y a continuación se centrifuga a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4°C.

El ARN precipitado se lava dos veces con etanol frío al 75% en agua estéril con DEPC (Sigma) y se resuspende en un volumen conveniente de agua estéril con DEPC. La cantidad y la calidad, indicada según el ratio A_{260}/A_{280} , del ARN se mide con un espectrofotómetro Nanodrop®. El ARN que se destinará a experimentos de PCR a tiempo real se diluye previamente a una concentración más manejable de 0,5µg/µL antes de la retrotranscripción a ADN complementario (cDNA).

Para el estudio de microarrays el material genético se purificó de impurezas posteriormente a la extracción, con RNeasy MinElute CleanUP kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones y se eluyó en agua estéril con DEPC, obteniendo una concentración final en torno a 1µg/µL.

Se realizaron 3 experimentos independientes para la obtención del ARN siguiendo la metodología descrita y tras la comprobación de la idoneidad y reproducibilidad de cada uno de ellos mediante PCR a tiempo real, seguidamente se combinaron empleando volúmenes iguales de cada uno y se interrogó mediante la técnica de chip de ADN, conocida de manera abreviada como “microarrays”.

9. Análisis de perfil transcripcional mediante microarrays.

Los cambios en la expresión génica en respuesta al agonista y al antagonista de LXR (GW3965 y GSK1440233A respectivamente) tomando este último o la línea inmortalizada LXR DKO como control, fue detectada con el chip de ADN GeneChip® Mouse Gene 2.0 ST de Affymetrix.

Los valores originales de expresión, obtenidos como logarítmicos en base 2 de la muestra problema con respecto a la expresión en la muestra de referencia, fueron procesados por la Unidad de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid.

No se tuvieron en cuenta para los análisis aquellas casillas del archivo Excel que no contaban con ninguna información relativa al nombre o símbolo del gen al que se refería la sonda. Se tomaron los números de acceso relativos a la base de datos GenBank/EMBL/DBJ de aquellas secuencias que presentaban una información incompleta y se convirtió al símbolo oficial del gen con la página web <https://biobnet-abcc.ncifcrf.gov/db/db2db.php> para su uso en el análisis de microarrays.

El programa R-Studio se usó cuando fue preciso identificar aquellos genes que eran comunes a dos o más grupos.

Sólo se consideraron los cambios en expresión génica como significativos si su magnitud es igual o mayor a dos veces con respecto a las condiciones de referencia. Para el análisis del conjunto de genes que reunía estas características se hizo uso de la base de datos gratuita DAVID 6.7, que ofrece una serie de herramientas bioinformáticas basados en diferentes algoritmos para el análisis de listas conteniendo numerosos genes, con el fin de encontrar un significado biológico subyacente que los interrelacione (Huang et al., 2007) (Huang et al., 2009). Los resultados obtenidos con DAVID 6.7 fueron principalmente derivados del uso de la herramienta *Functional Annotation Clustering* con los ajustes de configuración que figuran por defecto.

Asimismo se analizaron los genes para su clasificación en las rutas metabólicas canónicas y el estudio de las interacciones con otras moléculas, tanto biológicas como sintéticas, con el software Ingenuity® Pathway Analysis (IPA®). Este programa es una potente herramienta de búsqueda y análisis de datos “ómicos” basado en los datos disponibles de publicaciones científicas y algoritmos para la generación de redes de interacción entre moléculas. Los análisis fueron realizados con los ajustes que figuran por defecto.

10. Análisis de la expresión génica con RT-qPCR (reverse transcription quantitative polymerase chain reaction).

10.1. Retrotranscripción de ARN a ADN complementario.

Se empleó 1µg del ARN extraído por muestra para realizar la retrotranscripción a ADN complementario (cDNA) usando el iScript cDNA Synthesis kit™ (Bio-Rad) en un volumen final de 20µL, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las condiciones de retrotranscripción fueron: 5 minutos a 25°C, 30 minutos a 42°C y 5 minutos a 85°C, empleándose para ello un termociclador (Bio-Rad) y tubos con tapas ópticas (Bio-Rad). Al terminar la reacción se hizo una dilución 1:10 añadiendo 180µL de agua estéril DEPC a cada muestra.

10.2. Amplificación de ADN complementario por PCR cuantitativa (qPCR).

Para el análisis de la expresión génica se diseñaron cebadores que amplifican específicamente regiones concretas de los genes de interés, sintetizados por la empresa IDT. Se emplearon 5µL de la dilución de retrotranscripción de cada muestra a la que se añadió 15µL de la mezcla de: 2x PCR MasterMix (Diagenode) incluyendo la enzima Taq polimerasa en un tampón con MgCl₂ y nucleótidos, isotiocianato de fluoresceína (FITC) y el cóctel de cebadores específicos (pmix) a 0,4µM. Cada muestra fue cargada por duplicado en una placa de 96 pocillos (Bio-Rad) y sellada con adhesivo (Bio-Rad) o en tubos con tapa óptica (Bio-Rad) compatibles con el termociclador.

La fluorescencia fue recogida por el termociclador CFX connect™ (Bio-Rad) y analizada con el software asociado CFX Manager™ 3.0 Software. La expresión génica de todos los genes fue analizada mediante el método denominado $\Delta\Delta C_t$ (delta delta C_t) normalizando la expresión de cada muestra a la expresión endógena del gen elegido como referencia (36b4) y relativizada a los niveles detectados para la muestra de control experimental.

Las condiciones de los ciclos de amplificación del ADN fueron las siguientes:

95°C - 10 minutos
 95°C - 10 segundos
 60°C - 30 segundos
 72°C - 30 segundos

40 ciclos

Los cebadores empleados en la amplificación por qPCR fueron:

RT-qPCR para el análisis de expresión génica		
Gen diana	Secuencia (5'→3') FWD	Secuencia (5'→3') REV
ABCA1	GCAGATCAAGCATCCCAACT	CCAGAGAATGTTTCATTGTCCA
AIM (CD51)	TTTGTTGGATCGTGTTCAGACAG	CTTCACAGCGGTGGGCA
IL-1 α	TTGGTTAAATGACCTGCAACA	GAGCGCTCACGAACAGTTG
LBP	GCGCAAATCCTTCCTGAAAC	CACTGAAATGGTGACACCTTTGAC
LXR α	CCTTCCTCAAGGACTTCAGTTACA	CATGGCTCTGGAGAACTCAAAGAT
LXR β	CCCCACAAGTTCTCTGGACACT	TGACGTGGCGGAGGTACTG
MYLIP	ACCAGAACACCGCCCAATACAG	CCAGCTCCTTATGCTTCGCAAC
ORM-3	GCTGACTCAGACCCTGATTATAGGC	GACACAGTGGTCATCTTTGGTGTG
SCD1	TCAGCACTGGGAAAGTGAGG	AACTGGAGATCTCTTGGAGCAT
SREBF1	GGAGCCATGGATTGCACATT	GGCCCGGGAAGTCACTGT
36B4	GGCCCTGCACTCTCGCTTTC	TGCCAGGACGCGCTTGT

11. Análisis estadístico

Los datos de expresión obtenidos por PCR a tiempo real y los datos de enriquecimiento por inmunoprecipitación de cromatina se expresaron como la media de los resultados obtenidos de al menos dos o más experimentos independientes. Cada barra en el gráfico está acompañada de \pm el error estándar (SEM). La significancia estadística entre dos grupos fue estimada mediante el test t de Student no pareado. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos (*) cuando $p < 0,05$ y muy significativos (**) cuando $p < 0,01$. Para realizar los análisis se utilizó el paquete estadístico Prism5 (GraphPad Software).

12. Deleción de sitios genómicos de unión de LXR con la tecnología CRISPR.

La tecnología CRISPR (*Clustered Regularly-Interspaced Short Palindromic Repeats*) ha surgido en los últimos años como la herramienta más poderosa para la edición génica en células eucariotas. Basado en un sistema de defensa bacteriano contra bacteriófagos, este sistema permite delecionar o editar con gran precisión la secuencia genómica elegida, haciendo uso de la maquinaria de reparación celular mediante recombinación no homóloga (NHEJ) o recombinación homóloga (HDR) respectivamente. Su funcionamiento depende de la proteína Cas9 que es la encargada de seccionar las hebras de ADN, y que ha sido ampliamente modificada para diferentes fines, y el ARN guía (sgRNA) oligonucleótido que dirige la proteína Cas9 hacia los sitios precisos donde realizará su acción. La posibilidad de dirigir correctamente la maquinaria molecular de corte a una región concreta del genoma depende enteramente de la existencia de una secuencia corta llamada PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) que pueda ser reconocida por la proteína Cas9 y que dependerá de la especie bacteriana de la cual procede dicha proteína. En el caso de *Streptococcus pyogenes*, que es la Cas9 más empleada, la secuencia PAM tiene la forma: 5'-NGG-3', siendo N un nucleótido cualquiera.

Para la aplicación de la tecnología CRISPR hicimos uso de la proteína Cas9 proveniente de *Streptococcus pyogenes* con una mutación de cambio de sentido en la posición 10 de ácido aspártico a alanina (D10A), lo que se conoce como Cas9 *nickase* (Cas9n), ya que sólo es capaz de cortar una de las hebras de la doble cadena de ADN, es decir, produce una mella o *nick* en el ADN.

Con esta técnica pretendemos eliminar una región genómica que contiene el sitio de unión del heterodímero RXR-LXR (LXRE, *LXR Response Element*), bien caracterizado en el segundo exón del gen diana *Myliip* y en la región potenciadora de la transcripción del gen *Aim*. Dichos sitios de unión constan de dos repeticiones directas separadas por 4 nucleótidos al azar (motivo DR4) (Jakobsson et al., 2012).

Para la localización exacta en el genoma de la secuencia consenso de unión de las proteínas LXR (LXRE) se utilizó el programa DNASTAR Lasergene versión 6.1. Se realizó una búsqueda de la secuencia:

5'-NGKKYAnnnnNGKKYA-3'

donde "n" es cualquier nucleótido, "K" es G o T, "Y" es C o T.

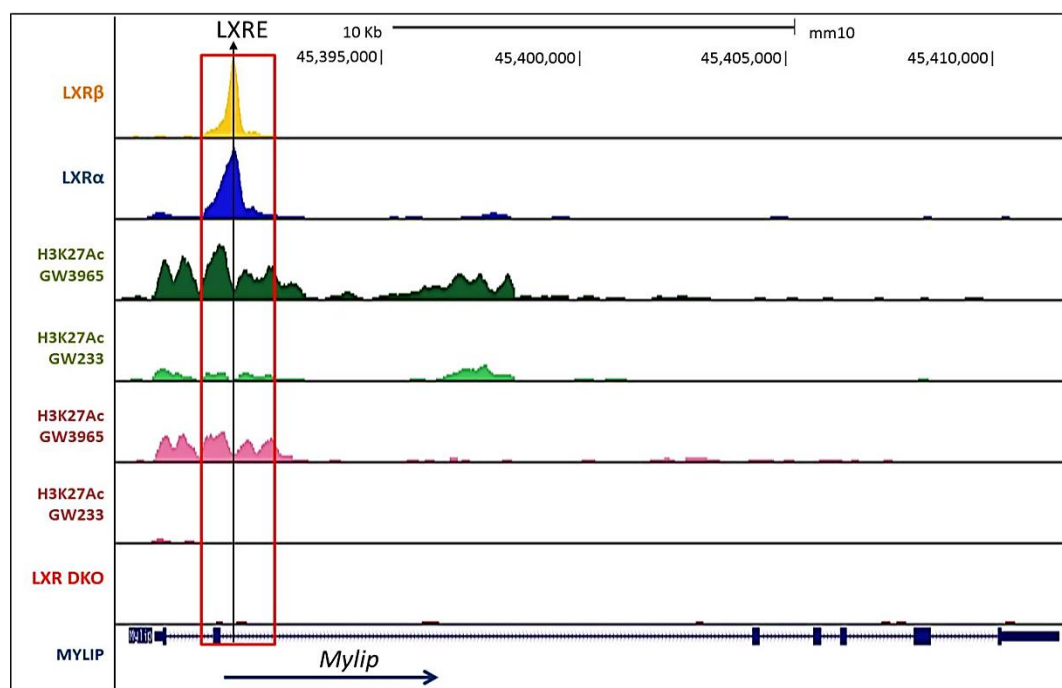
Fueron seleccionadas únicamente las secuencias localizadas por el programa que contaban con un porcentaje de coincidencia con la secuencia consenso de más de 88% (es decir, son coincidentes en 14 de los 16 nucleótidos que componen el elemento de respuesta a LXR).

12.1. Diseño del ARN guía (gRNA) e inserción en el plásmido pX461.

Para el uso de la Cas9n es preciso emplear una pareja de ARN guías (ARNg), cuyas secuencias se diseñaron en la web de DNA2.0 (<https://www.dna20.com/eCommerce/cas9/input>) eligiendo entre las posibilidades que ofrece el programa aquellas con mayor puntuación o *score*. En el caso del gen *Myliip*, la secuencia de interés que se interrogó para la búsqueda de los ARN guías fue de 505 nucleótidos y contenía centrado el motivo LXRE. Las guías con mejores puntuaciones se encontraban en las posiciones 252 y 337 en la secuencia interrogada, lo que produciría una delección de 100 pares de bases en el ADN genómico, incluyendo la secuencia del motivo LXRE. En el caso de la región potenciadora de la transcripción del gen *Aim*, se interrogó una secuencia de 898 pares de bases conteniendo el motivo de unión del heterodímero RXR-LXR detectado por el programa DNASTAR Lasergene. Las guías con mejores puntuaciones se encontraban en las posiciones 507 y 416 en la secuencia interrogada.

Una vez elegidos los ARN guía se ordenó su síntesis y también la de las hebras complementarias de cada uno, siguiendo una serie de directrices descritas previamente (Ran et al., 2013).

Representación del gen *Myliip* visualizado con Genome Browser:



Pareja de ARN guías diseñadas para la delección con Cas9n del motivo LXRE en el gen *Myliip*:

Secuencia ARNg-1 (posición 337) 5'→3'	Secuencia ARNg-1 complementario (posición 337) 5'→3'
CACCGCCTCTGGGTTACTTAAACT	AAACAGTTTAAGTAACCCAAGAGGC
Secuencia ARNg-2 (posición 252) 5'→3'	Secuencia ARNg-2 complementario (posición 252) 5'→3'
CACCGTGCTGAGGCGGGGTACTAG	AAACCTAGTAACCCCGCCTCAGCAC

Pareja de ARN guías diseñadas para la delección con Cas9n del motivo LXRE en el gen *Aim*:

Secuencia ARNg-1 (posición 507) 5'→3'	Secuencia ARNg-1 complementario (posición 507) 5'→3'
CACCGTTTCATTCTGCATTGCATT	AAACAATGCAATGCAGAAATGAAAC
Secuencia ARNg-2 (posición 416) 5'→3'	Secuencia ARNg-2 complementario (posición 416) 5'→3'
CACCGCTTGCTCATGATTGCATGGC	AAACGCCATGCAATCATGAGCAAGC

Para la unión de las hebras complementarias, se emplea 5µL de cada una (resuspendidas en agua estéril a 100µM), 2µL de tampón de la ligasa T4 (Thermo Fisher Scientific) y 8µL de agua estéril. Se introducen los tubos en el termociclador y se programa 10 minutos a 95°C y una vez pasado el tiempo se apaga la máquina y se deja enfriar durante 1 hora. Se digiere el plásmido desde donde se expresará la proteína Cas9n, que fue obtenido originalmente de Addgene y posteriormente cedido amablemente por el Dr. Tomas Jakobsson. Dicho plásmido puede encontrarse bajo el nombre de: pSpCas9n (BB)-2AGFP (ID: 48140), también conocido como pX461. La digestión se llevó a cabo en 20µL de reacción final con: 1µL de la enzima Bpi I (Bbs I) (Fast Digest™ Thermo Fisher Scientific), 2µL del tampón Fast Digest™, 2µL del plásmido pX461 (aproximadamente a 500ng/µL) y 15µL de agua estéril durante 1 hora a 37°C. Pasado ese tiempo se insertan por separado cada uno de los ARN guía de la pareja en un plásmido pX461, añadiendo directamente a la mezcla anterior: 1µL de la reacción de anillamiento, 2,5µL de tampón de la ligasa T4 y 1,5µL de ligasa T4 (Thermo Fisher Scientific) y se incuba durante 1 hora a 37°C.

Seguidamente se procede a amplificar el plásmido ligado mediante transformación de bacterias competentes, forzándolas a adquirirlo mediante un choque térmico, usando todo el volumen de reacción en 15µL de bacterias aproximadamente. Se permitirá el crecimiento sólo los clones bacterianos que han incorporado el pX461 ligado cultivando en placa con medio LB que incluye ampicilina (100µg/mL) durante 12-16 horas. Al día siguiente se seleccionan de 2 a 5 colonias y se inoculan en medio LB líquido con ampicilina para su crecimiento durante 12-16 horas. Se recupera el ADN plasmídico amplificado con el kit QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen®), eluido en agua estéril y posteriormente se envió una muestra de 20µL a una concentración de 100ng/µL para secuenciar, empleando para la secuenciación el cebador hU6 (5'-GAGGGCCTATTTCCTCATGATTCC-3').

12.2. Transfección de las células diana y selección de células positivas.

Una vez verificada la secuencia de los plásmidos pX461 con los ARN guía insertos se usaron para la transfección de las células diana, la línea celular de macrófago RAW 264.7. Las células se cultivaron 24 horas hasta que alcanzaron una densidad óptima de aproximadamente el 60% y después se transfectaron 2µg totales de ADN (1µg de cada uno de los ARN guía inserto en pX461) con FuGENE® HD (Promega) mezclado en un ratio de 1:2 (ADN: FuGENE) en medio Opti-MEM® (Gibco). Asimismo, se prepara un control negativo con células a las que se transfectará con el plásmido pX461 sin inserto de ARN guía y que por tanto no sufrirá alteraciones en su genoma con la tecnología CRISPR. La transfección continúa 48 horas y tras ese tiempo se lavan y desprenden de la placa de cultivo en esterilidad con medio sin suero para reducir la adherencia entre ellas y se hacen pasar a través de filtros Filcon® (BD Biosciences) de 50µm de diámetro de poro para eliminar los dobletes celulares. Se procede a la separación celular mediante citometría de flujo de aquella población que expresan la proteína verde fluorescente (GFP), gen incluido también en el plásmido pX461 como método de control de su adquisición. Se empleó un citómetro separador de la marca FACSAria II en el centro de análisis celular (CCA) del Hospital Universitario del Instituto Karolinska. Por separado se selecciona también la población que expresa GFP en el control negativo. Adicionalmente las células muertas se discriminaron del resto por la previa adición de 1µL del colorante Sytox® Blue Dead Cell Stain (Thermo Fisher Scientific). La eficiencia de transfección que se obtuvo fue de aproximadamente 1,5% (en torno a 300 células).

Todas las poblaciones de células seleccionadas se recogieron en un pocillo de una placa multiwell de 12 pocillos y se incubaron hasta la recuperación de su tasa de división, en torno a 48 horas después. Después de su disgregación se cuentan y se prepara una dilución para obtener una concentración de aproximadamente 10 células/mL en 10mL finales de DMEM. Se distribuyen 100µL de esta dilución en cada pocillo de una placa multiwell de 96 pocillos. Al cabo de unas horas se observa la placa al microscopio óptico para identificar los pocillos que incluyen una sola célula y se descartan aquellos que incluyan dos o más. El resto de células de la población original se congela por si hubiera que repetir la técnica. Se incuban las células provenientes de una sola célula madre, subcultivando a formatos de placa más grandes hasta que haya suficientes como para obtener ADN genómico de ellas y comprobar si ha sido posible llevar a cabo la delección con éxito. La obtención del ADN genómico se realiza con 50µL -100µL de la mezcla: NaOH 25mM y EDTA 0,2mM pH12 que se incuba durante 10 minutos a 95°C, después se transfieren los tubos a una cubeta de hielo y se añaden 5µL -10µL de Tris-HCl 40mM pH5, se centrifuga 10 minutos a 15.000 rpm y se recupera el sobrenadante, del que se utilizará 5µL para amplificación por qPCR.

Para realizar la qPCR se diseñaron una pareja de cebadores que se unen flanqueando la región que se delecionó y que produce un tamaño de amplicón de aproximadamente 500 pares de bases para ambos genes. La amplificación se realizó con 1µg de ADN genómico, dNTPs a 10mM (GenScript), MgCl₂ a 50mM (BioRad), tampón 5x Green Buffer GoTaq® (Promega), mezcla de cebadores a 10µM y ADN polimerasa Green Taq (GenScript) en un volumen final de 15µL.

Material y métodos

Las condiciones de la amplificación por qPCR fueron:

95°C - 2 minutos
95°C - 15 segundos
57°C - 30 segundos
68°C - 1 minuto
68°C - 10 minutos

37 ciclos

Se separó en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio este producto de amplificación y el resultante tras usar los mismos cebadores sobre el ADN genómico del control negativo. Se expuso el gel a la luz ultravioleta en el lector de geles ChemiDoc XRS® e identificamos las células portadoras de la delección del sitio de unión de LXR por la diferencia de movilidad de los fragmentos amplificados.

Cebadores empleados para corroborar por PCR la delección por CRISPR en el ADN genómico:

Gen diana	Secuencia sentido 5'→3'	Secuencia antisentido 5'→3'
MYLIP	GGTAAAGCGAGGCCGAAACA	ACAGTGGCCCCTCAAAGAGT

Una vez identificados las células positivas para la delección se cortan las dos bandas (una por cada alelo delecionado) resultantes de la amplificación por PCR con un escalpelo y se extraen por separado con el kit QIAquick extraction kit de Qiagen®. Cada fragmento de ADN genómico es a continuación ligado al vector T (pGEM®-T Easy Vector, Promega) para su amplificación con: 0,5µL de vector, 8,5µL del fragmento, 1µL de ligasa T4 y 10µL de buffer de ligación en un volumen final de 20µL. La mezcla se deja reaccionar durante toda la noche a una temperatura constante de 16°C. Seguidamente se procede a amplificar el plásmido ligado mediante transformación de bacterias competentes, forzándolas a adquirirlo mediante un choque térmico. Se permitirá el crecimiento de los clones bacterianos que han incorporado el vector T ligado cultivando en placa con medio LB que incluye ampicilina (100µg/mL) durante 12-16 horas. Al día siguiente se seleccionan de 2 a 5 colonias y se inoculan en medio LB líquido con ampicilina para su crecimiento durante 12-16 horas. Se recupera el ADN plasmídico amplificado con el kit QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen®), eluído en agua estéril y posteriormente se utiliza una alícuota de 20µL a una concentración de 100ng/µL para secuenciación y verificación de la delección.

13. Incubación de extractos de proteínas nucleares con oligonucleótidos biotinilados y western blot.

Con la ayuda de la herramienta bioinformática de visualización del genoma Genome Browser se diseñaron oligonucleótidos de 34 pares de bases que incluían la secuencia consenso de unión de LXR en el *enhancer* del gen *Aim* (*Cd5l*) y de uno de los sitios de unión de LXR en el gen *Abca1*, situado en el sitio de inicio de la transcripción (TSS), a modo de control positivo. El control negativo fue el mismo oligonucleótido de *Aim*, pero sin la secuencia consenso de unión de LXR, que fue alterada introduciendo bases al azar en esa posición. Cada pareja de oligonucleótidos fue sintetizada con una modificación de biotina ligada al extremo 5' de la secuencia de uno de ellos.

Las secuencias de los oligonucleótidos empleados fueron:

Gen	Secuencia sentido 5'→3'	Secuencia antisentido 5'→3'
ABCA1	[Btn]CGAGCGCCGGGGTTACTACCGGTCAAACGCTGTT	AACAGCGTTTGACCGGTAGTAACCCCGGCGCTCG
AIM (CD5l)	[Btn]TTGGCTAGAACTTGACCTGCTTTTGTAGCATG	CATGCTAGCAAAAAGCAGGTCAAGTTCTAGCCAA
AIM mutado	[Btn]TTGGCTAGAACTCACTTGGCTTACATGCAGCATG	CATGCTGCATGTAAGCCAAGTGAGTTCTAGCCAA

Para unir los oligonucleótidos complementarios diseñados para cada gen se mezclan 5µg de cada uno (resuspendidas en agua estéril a 1µg/µL), 2µL de tampón de la ligasa T4 (Thermo Fisher Scientific) y 8µL de agua estéril. Se introducen los tubos en el termociclador y se programa 10 minutos a 95°C y una vez pasado el tiempo se apaga la máquina y se deja enfriar durante 1 hora.

Para la extracción de los extractos proteicos nucleares se prepara un tampón hipotónico con HEPES 10mM pH8, EGTA 1mM, EDTA 1mM, KCl 10mM, suplementado con DTT 1mM e inhibidor de proteasas Complete® añadidos frescos. De este tampón se usarán 600µL para lisar células provenientes de una placa de 10mm de diámetro con células RAW 264.7 a confluencia que expresan LXRα murino o RAW 264.7 de cepa salvaje. Primero se resuspenden en 200µL tras recogerse de la placa y a continuación se añaden los 400µL restantes. Tras 15 minutos en hielo se añaden 30µL de NP-40 al 10% y se agita violentamente 5 segundos con el vórtex. Se centrifuga 30 segundos a 13.000rpm a 4°C y se retira el sobrenadante resultante, que es el extracto proteico citosólico. Añadir 70µL de tampón de lisis de núcleos compuesto de: HEPES 20mM pH8, EGTA 1mM, EDTA 1mM, NaCl 400mM, suplementado con DTT 1mM e inhibidor de proteasas Complete® añadidos frescos. Se agitan los tubos durante 30 minutos a 4°C en vórtex a un cuarto de su velocidad total. Se centrifugan 5 minutos a 13.000rpm en frío y a continuación se toma el sobrenadante que contiene el extracto proteico nuclear.

Material y métodos

La incubación de los extractos nucleares con los oligonucleótidos biotinilados se realiza en un tampón (tampón A) con detergente suave para evitar inhibir las interacciones proteínas-oligonucleótido compuesto de NaCl 150mM, HEPES 10mM pH7,4, 0,2% NP-40, 8% glicerol y suplementado con DTT 4mM e inhibidor de proteasas Complete® añadidos frescos. También se usa este tampón para resuspender 20μL de esferas magnéticas acopladas a estreptavidina (Cell Stem) en 800μL, a las que previamente se realizan 3 lavados con PBS. Al volumen de las esferas se añaden 25μL de extracto de proteína nuclear diluido en 200μL de tampón A y 1μg de oligonucleótido biotinilado para cada gen por tubo, resultando todo en un volumen final de 1mL. Para aumentar la eficiencia de la interacción se activa selectivamente el receptor nuclear LXR añadiendo a la mezcla anterior su ligando sintético específico GW3965 a 1μM. La incubación de los componentes se realiza a 4°C en rotación suave durante 2 horas.

A continuación se prepara tampón con HEPES 20mM pH 7,7, KCl 50mM, 20% glycerol, 0,1% NP-40 e inhibidor de proteasas Complete® (tampón H) a 4°C con el que se realizan 4 lavados a las esferas magnéticas, inmovilizándolas en un soporte magnético. Tras el último lavado se añaden 25μL de tampón de carga y se hierven las muestras durante 10 minutos antes de resolverlas por electroforesis SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10%. Las proteínas LXRα/β fueron detectadas con el anticuerpo policlonal específico, cedido amablemente por el Dr. Eckardt Treuter del Instituto Karolinska.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Generación de una línea inmortalizada de macrófagos carente de la expresión de ambos receptores nucleares LXR α y LXR β .

1.1. Caracterización fenotípica de la línea celular inmortalizada de macrófagos LXR DKO.

Nuestro principal objetivo fue estudiar las funciones biológicas individuales de cada uno de los receptores nucleares LXR. Como paso inicial a la obtención de un modelo celular de utilidad para estudiar las funciones de ambos LXR por separado, generamos a partir de células de médula ósea de animales deficientes en LXR (LXR DKO) y durante la diferenciación hacia macrófago, una línea inmortalizada carente de LXR mediante el sistema de retrovirus J2.

Realizamos un seguimiento a través del microscopio óptico del crecimiento y transformación de las células durante los primeros 10 días, tras la infección retroviral. Pudimos observar que la morfología estrellada y extendida característica de los macrófagos derivados de la médula ósea (Fig. 1A) evoluciona hacia otra esférica que se hace cada vez más patente según avanza el proceso de inmortalización (Fig. 1B y C). La disposición celular durante el crecimiento se produce en agrupaciones de forma circular que van aumentando en tamaño hasta cubrir la superficie de cultivo sin perder su morfología redondeada.

En paralelo a la generación de la línea inmortal LXR DKO, también se generó, por parte de otro miembro de nuestro laboratorio, una línea inmortal LXR WT. Para comprobar que ambas líneas expresan niveles equivalentes de marcadores fenotípicos de macrófagos, comparamos por citometría de flujo los niveles de expresión de marcadores típicos de macrófagos. Examinamos los niveles de expresión de los marcadores más característicos: CD11b (integrina implicada en la adhesión y migración de estas células a zonas inflamadas), F4/80 (miembro de la familia de moléculas de tipo EGF, factor de crecimiento epidérmico, abundantemente expresado en macrófagos residentes), CD68 (glicoproteína también llamada macrosialina, se encuentra abundantemente en los endosomas tardíos), receptor de tipo *toll*-4 (TLR4, receptor de lipopolisacárido bacteriano), CSF1R (receptor del factor estimulador de colonias 1, principal responsable de la diferenciación, funcionamiento y división celular de macrófagos), Ly6C (proteína anclada por glicosilfosfatidilinositol, muy abundante en monocitos de tipo “inflamatorio”), Tim4 (receptor de fosfatidilserina). Pudimos comprobar que las células inmortalizadas provenientes de macrófagos derivados de médula ósea que cuentan con la expresión de estas moléculas y que en ambos genotipos se observan en proporciones similares (Fig. 2).

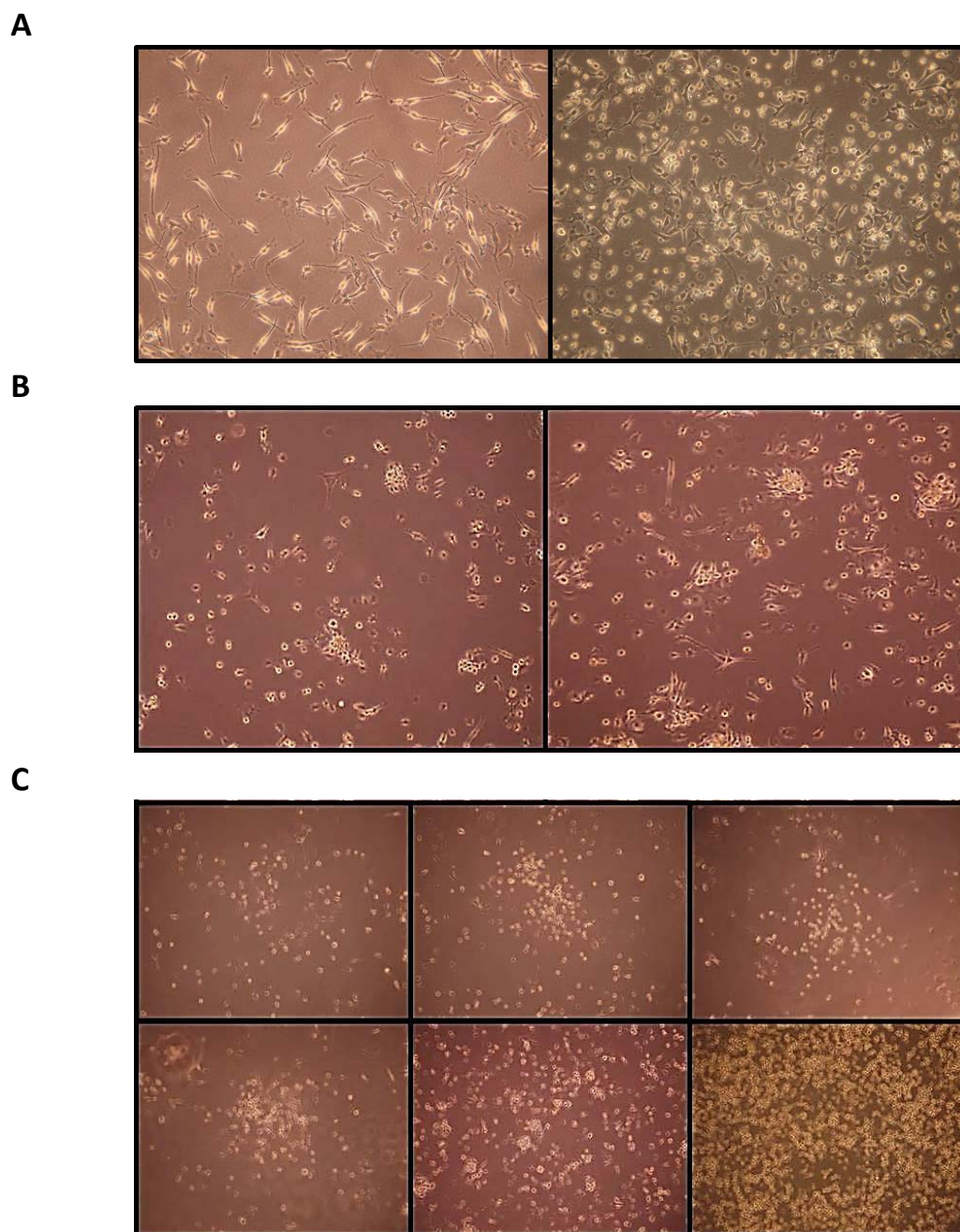
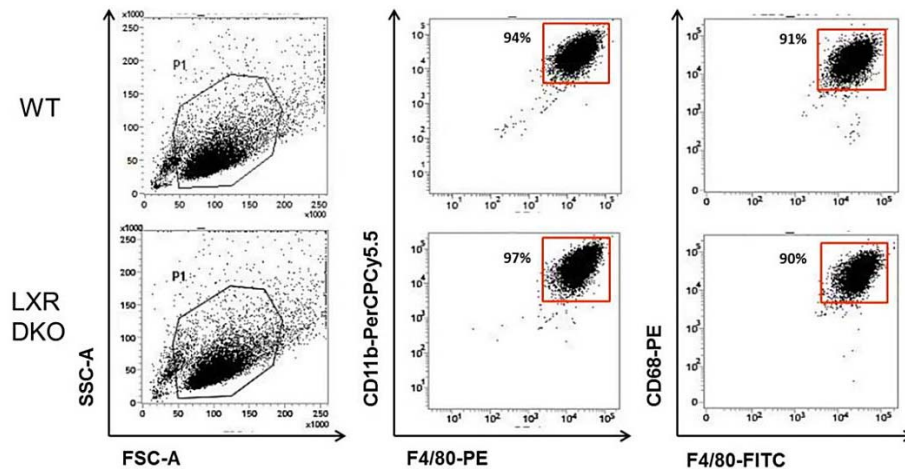
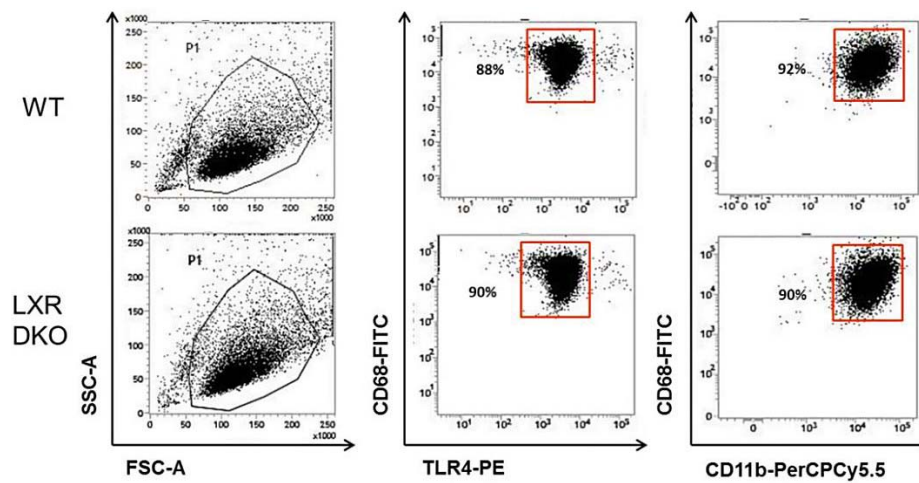


Figura 1. Etapas de crecimiento de la línea inmortalizada de macrófago LXR DKO. Los macrófagos diferenciados de médula ósea poseen una morfología alargada o estrellada propia de este tipo celular (A). La línea celular inmortalizada con retrovirus J2 en crecimiento forma agrupaciones características con forma circular (B) que aumentan en tamaño hasta cubrir la superficie del soporte de cultivo (C). Observaciones realizadas con microscopía óptica a 10x aumentos.

A



B



C

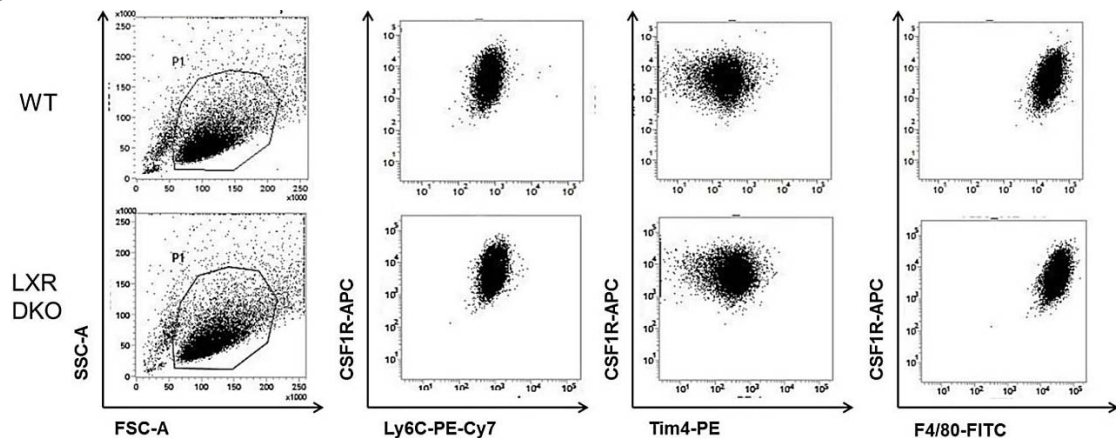


Figura 2. La ausencia de expresión de LXR no afecta al fenotipo de los macrófagos derivados de médula ósea. La expresión de moléculas propias del fenotipo de macrófago en células diferenciadas de médula ósea de ratones LXR DKO fue analizada por citometría de flujo. Se muestra la expresión de los mismos marcadores en células derivadas de médula ósea de genotipo salvaje (LXR WT). Delimitada dentro de cada gráfica a la izquierda se indica la población celular sobre la que se analizó el fenotipo (P1). En cada gráfica y junto al recuadro rojo aparece el porcentaje de células positivas con los marcadores indicados.

1.2. Caracterización de la expresión y regulación de los genes diana de LXR en líneas immortalizadas de macrófago que expresan los receptores 3FLAG-LXR α y 3FLAG-LXR β .

Una vez generada la línea de macrófagos inmortales LXR DKO, se procedió a la expresión de forma suprafisiológica de los receptores LXR α o LXR β humanos, unidos al polipéptido FLAG, mediante infección retroviral de la información genética de estos receptores separadamente, creando así dos líneas de macrófagos immortalizados que expresan únicamente uno de los receptores nucleares LXR.

La comprobación de los niveles de expresión de las proteínas LXR en las líneas generadas se realizó por western blot, con un anticuerpo monoclonal dirigido contra el péptido FLAG y un anticuerpo policlonal que reconoce ambos receptores LXR, cedido amablemente por los Doctores Eckardt Treuter y Knut Steffensen del Instituto Karolinska, Suecia (Pehkonen et al. 2012). El análisis comparativo indicó que los niveles de expresión de LXR α en la línea 3FLAG-LXR α eran superiores a los observados en células primarias (macrófagos peritoneales), pero inferiores a los de la línea RAW 264.7 LXR α , que también fue generada en nuestro laboratorio (Fig. 3). Sin embargo, eran niveles comparables con la otra línea immortalizada 3FLAG-LXR β , lo cual es deseable para evitar descompensaciones entre las líneas y conclusiones erróneas debidas a distintos niveles de expresión. Por tanto, el análisis de expresión proteica de LXR α y LXR β en las líneas immortalizadas reveló que ambos receptores se encuentran presentes en niveles similares.

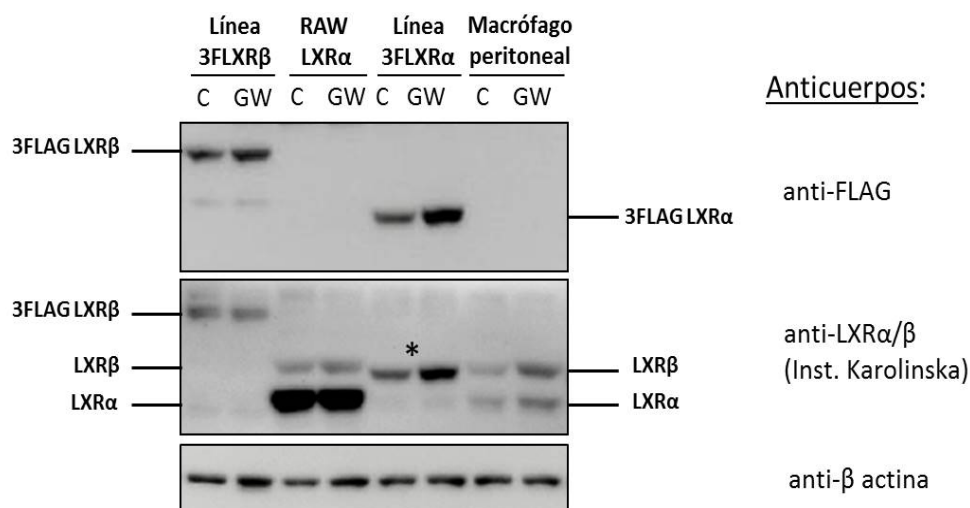
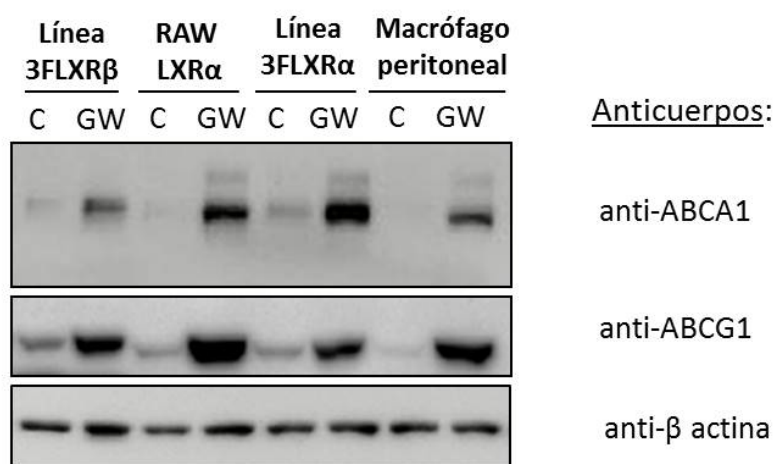


Figura 3. Niveles de expresión de LXR α y LXR β en las líneas de macrófago immortalizadas 3FLAG-LXR α y 3FLAG-LXR β . Las líneas immortalizadas de macrófago fueron cultivadas en presencia de DMSO (vehículo control) o el agonista sintético de LXR, GW3965, durante 24 horas previamente a la extracción de proteína total y evaluación por western blot con anticuerpos específicos para la cola polipeptídica FLAG o los receptores LXR α y LXR β (Pehkonen et al., 2012). Como controles positivos se utilizó un extracto proteico de la línea celular de macrófago RAW 264.7 que expresa LXR α y de macrófago peritoneal. Se muestra una figura representativa de 3 experimentos independientes. *Representa la expresión de 3FLAG-LXR α , con un peso molecular similar a LXR β endógeno.

Resultados

Para comprobar la funcionalidad de los receptores LXR expresados en las líneas inmortalizadas, evaluamos su capacidad de regulación de la transcripción de los genes diana ya conocidos *Abca1* y *Abcg1*. Para ello analizamos sus niveles proteicos mediante western blot, tras el tratamiento de las células con vehículo control o el agonista sintético GW3965 durante 24 horas. Comprobamos que la expresión de proteínas ABCA1 y ABCG1 aumentaba potentemente tras el tratamiento con el agonista en ambas líneas 3FLAG-LXR α y 3FLAG-LXR β (Fig. 4A).

A



B

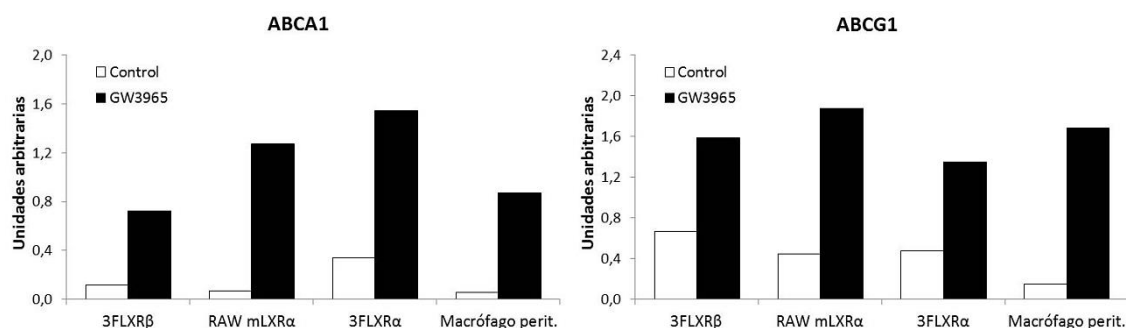


Figura 4. Regulación de la expresión de los genes diana clásicos de LXR en las líneas inmortalizadas de macrófago 3FLAG-LXR α y 3FLAG-LXR β . Las células fueron cultivadas en presencia de DMSO o el agonista GW3965 durante 24 horas. La expresión proteica de ABCA1 y ABCG1 fue analizada por western blot (A). La intensidad de las bandas de proteína se cuantificó con el programa Image J y se muestra relativizada a la intensidad de β -actina en unidades arbitrarias (B). Se emplearon los mismos extractos proteicos que en la Figura 3. Se muestra una figura representativa de 3 experimentos independientes.

Resultados

Sometimos las líneas inmortalizadas que expresan los receptores LXR a dos condiciones de serodepresión de distinta severidad para analizar la expresión de los genes diana tras exposición al agonista sintético GW3965. Empleamos un medio de cultivo de serodepresión que tradicionalmente hemos empleado para privar a las células de un exceso de nutrientes, con el objetivo de reducir la disponibilidad de ligandos endógenos de LXR (oxisteroles derivados del suero o síntesis endógena de colesterol) y conseguir unos experimentos más reproducibles y una inducción de la expresión de los genes diana de LXR, al suministrar los tratamientos farmacológicos, más potente. Este medio de cultivo contiene un 0,5% de suero bovino fetal. Al mismo tiempo, utilizamos otro medio de serodepresión de mayor severidad conteniendo un 0,2% de albúmina de suero bovino (BSA), totalmente libre de ácidos grasos y suplementado con ácido zaragócico (ver material y métodos).

No registramos grandes diferencias en la inducción de la expresión génica entre las dos condiciones de serodepresión, pero cabe destacar que el nivel basal de expresión proteica de *Abca1* disminuye apreciablemente en presencia del medio de cultivo con 0,2% de albúmina de suero bovino (BSA) con ácido zaragócico (Fig. 5A y B) en ambas líneas celulares. Sin embargo, el gen *Abcg1* se mantiene con un nivel basal homogéneo, aunque la línea 3FLAG-LXR α parece ser más sensible al medio con 0,5% de suero bovino fetal.

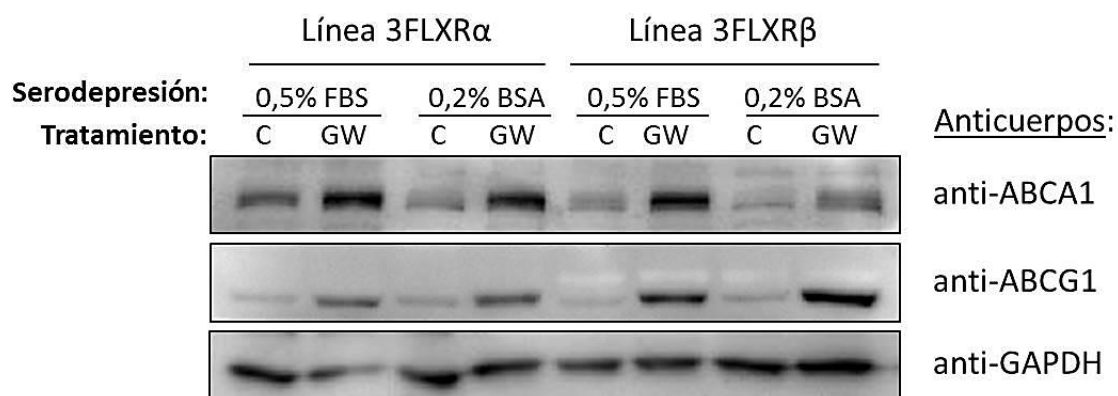
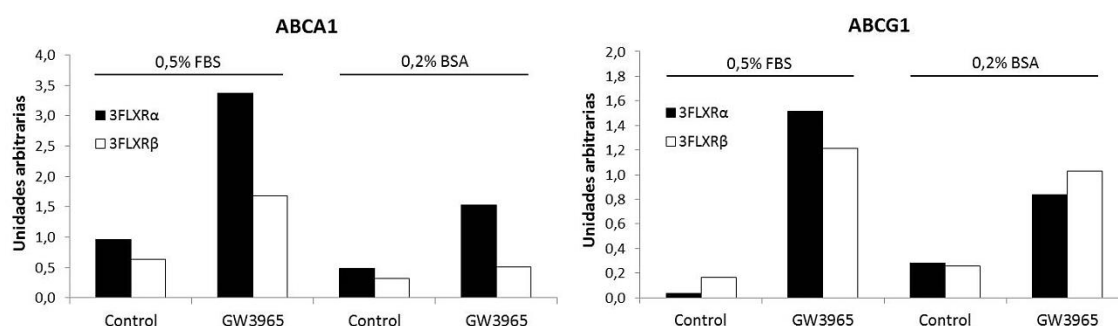
A**B**

Figura 5. Regulación de la expresión de genes diana de LXR en las líneas inmortalizadas de macrófago 3FLAG-LXR α y 3FLAG-LXR β bajo dos condiciones de serodepresión distintas. En un caso, se cultivaron en medio clásico de serodepresión (0,5% de suero bovino fetal, FBS) y en otro caso, medio con BSA libre de ácidos grasos (0,2% BSA libre de ácidos grasos) y con ácido zaragócico 2 μ M durante 4 horas previamente a la adición del agonista sintético de LXR GW3965 durante 24 horas. La regulación de la expresión de varios genes diana de LXR fue examinada por western blot (A). La intensidad de las bandas fue cuantificada con el programa Image J y se muestran normalizadas a los niveles de la proteína GAPDH (B).

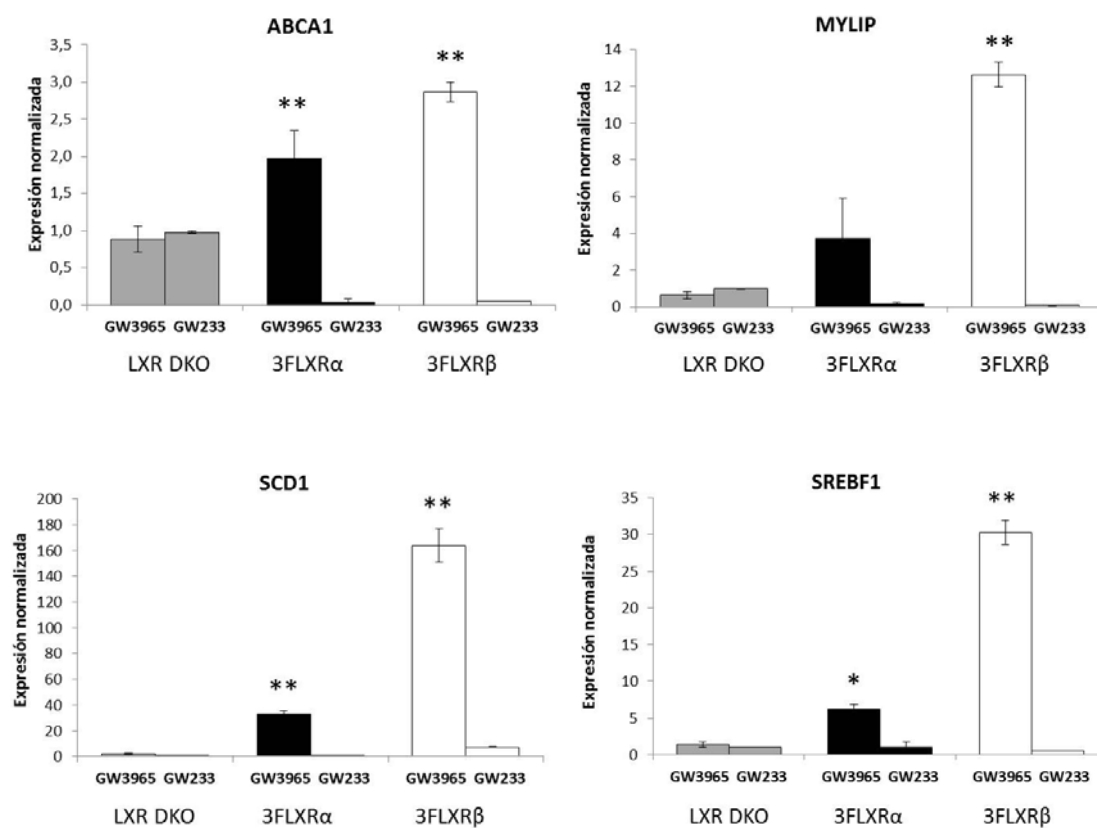
2. Análisis de la expresión génica de las líneas inmortalizadas de macrófago con chip de ADN (microarrays).

Con el objetivo de profundizar en el estudio de la regulación génica bajo el control de cada uno de los receptores nucleares LXR, se llevó a cabo un estudio de microarrays (chip de ADN) empleando el ARN purificado de las 3 líneas inmortalizadas generadas: 3FLAG-LXR α , 3FLAG-LXR β y LXR DKO control.

La validación por qPCR de la expresión de los genes diana *Abca1*, *Myliip*, *Scd1* y *Srebf1* demostró que su transcripción es sensible al tratamiento con el agonista y antagonista específicos de LXR (Fig. 6A). La expresión de estos genes diana se encuentra disminuida potentemente en presencia del antagonista GW233, mientras que en presencia del agonista GW3965 aumenta varios órdenes de magnitud en los casos de *Scd1* y *Srebf1* con respecto a la expresión del gen de referencia elegido, *36b4*. La expresión de ARN mensajero, correspondiente al gen diana específico de LXR α *Aim* (*Cd5l*) fue evaluada en todas las líneas inmortalizadas, pudiendo comprobarse que su expresión sólo es inducible por el tratamiento farmacológico en la línea inmortalizada 3FLAG-LXR α (Fig. 6B), no siendo así en las restantes líneas. Este resultado valida la funcionalidad del receptor LXR α en la línea celular de expresión generada.

Resultados

A



B

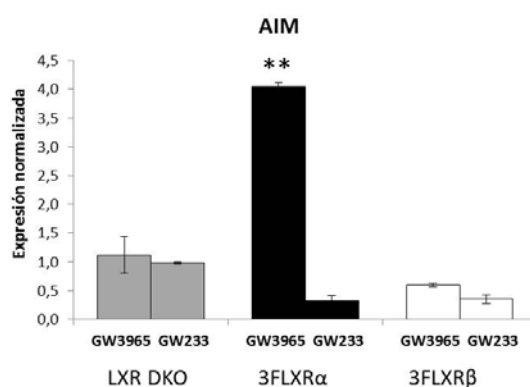


Figura 6. Validación de la funcionalidad de los receptores LXR expresados en las líneas inmortalizadas de macrófago. Las líneas de macrófago 3FLAG-LXR α , 3FLAG-LXR β y LXR DKO fueron tratadas con el agonista y antagonista sintéticos (GW3965 y GW233 respectivamente) a 1 μ M durante 24 horas antes de purificar el ARN mensajero y examinar la expresión de los genes diana clásicos de LXR (A) y el gen diana específico de LXR α *Aim* (también conocido como *Cd5l*, *Api6* o *Spa*) (B) por PCR cuantitativa en tiempo real. Se muestran los valores medios de al menos 3 experimentos independientes y en cada barra el error estándar (SEM). La significancia estadística es *p < 0,05 y **p < 0,01 de la expresión con el agonista en referencia a la expresión con el antagonista.

Una vez comprobada la expresión génica en las distintas líneas inmortalizadas, el ARN mensajero extraído de los 3 experimentos independientes se combinó y fue interrogado para la expresión de una serie de aproximadamente 34.000 genes y transcritos representativos del genoma de ratón, entre los que se incluyen todas las dianas clásicas conocidas de LXR, a través de la plataforma de microarrays GeneChip® Mouse Gene 2.0 ST de Affymetrix. La expresión de los genes diana de LXR conocidos previamente se verificó en el chip de ADN (Fig. 7), representado como un ratio entre la transcripción registrada con el tratamiento farmacológico del agonista GW3965 frente a la transcripción en presencia del antagonista GW233.

Para el análisis de expresión génica mediante microarrays se eligieron dos tipos de condiciones de referencia a las que se relativizó la expresión de cada línea celular:

- I. Expresión génica registrada en presencia del antagonista sintético de LXR (GW233) en cada una de las líneas inmortalizadas.
- II. Expresión génica observada en la línea inmortalizada LXR DKO, en presencia del agonista de LXR GW3965.

La transformación de los valores de expresión se realizó en la Unidad de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid, relativizando entre los grupos: cada línea que expresa una de las proteínas LXR es relativizado alternativamente a la expresión en esa línea en presencia del antagonista de LXR GW233, a la expresión en la línea control LXR DKO en presencia del agonista, o la línea 3FLAG-LXR α en comparación con 3FLAG-LXR β y viceversa.

Por lo tanto, los grupos de análisis de expresión génica que se establecieron fueron los siguientes:

1. Línea LXR DKO, expresión con GW3965 comparado con GW233.
2. Línea 3FLAG-LXR α , expresión con GW3965 comparado con GW233.
3. Línea 3FLAG-LXR β , expresión con GW3965 comparado con GW233.
4. Expresión en la línea 3FLAG-LXR α comparado con LXR DKO.
5. Expresión en la línea 3FLAG-LXR β comparado con LXR DKO.
6. Expresión en la línea 3FLAG-LXR β comparado con 3FLAG-LXR α .
7. Expresión en la línea 3FLAG-LXR α comparado con 3FLAG-LXR β .

La transcripción génica derivada del tratamiento con agonista contrasta con la generada en presencia del antagonista, cuya actividad se ha descrito como unión al receptor LXR y bloqueo su activación mediante distorsión de la estructura tridimensional del receptor (Zuercher et al. 2010), lo que contribuye a acentuar las diferencias en los niveles de expresión de genes dependientes de LXR y lo que sumado a la fuerte expresión con la que cuentan las líneas inmortalizadas favorece la identificación de nuevas dianas de LXR.

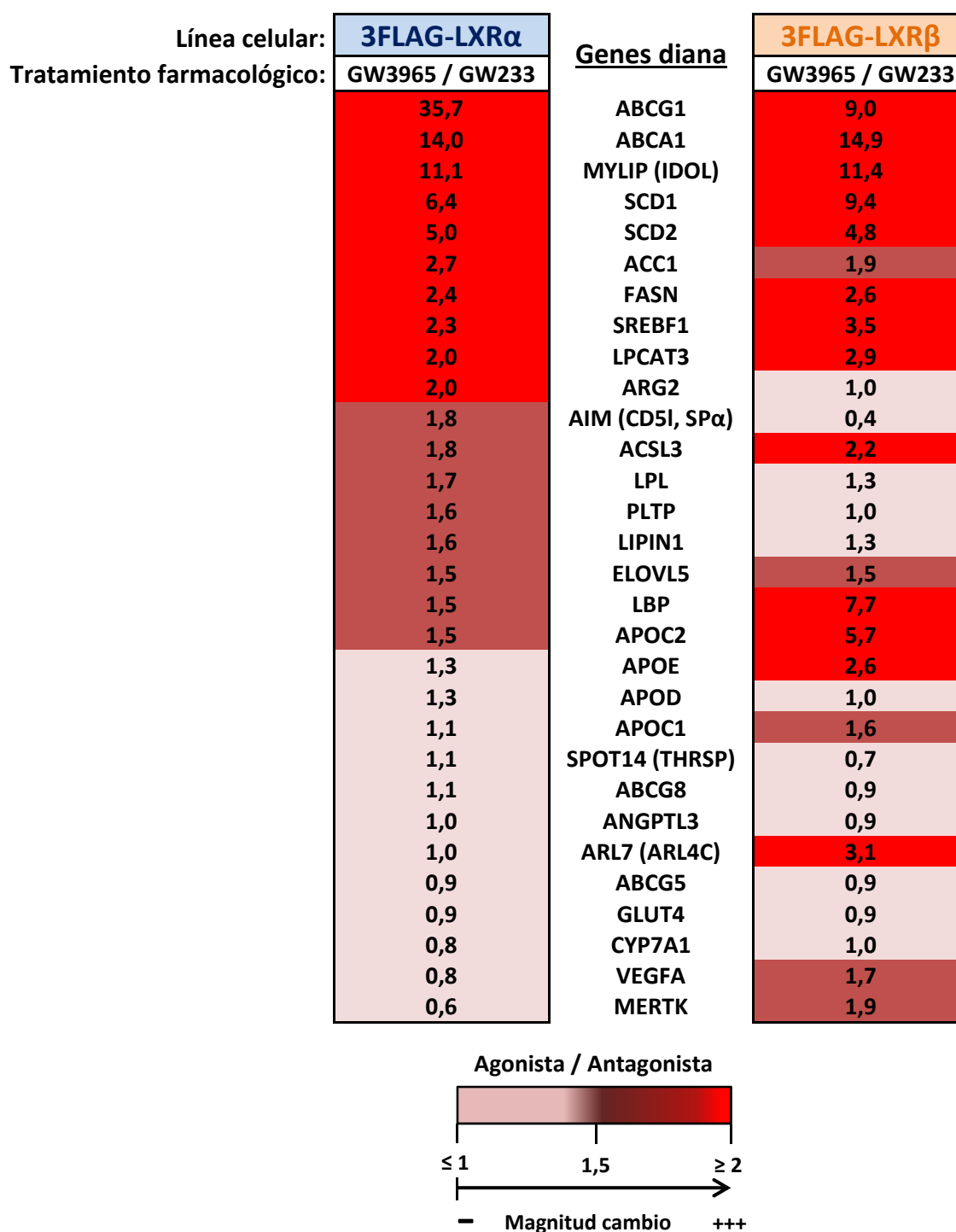


Figura 7. Representación simplificada de la magnitud de expresión de los genes diana de LXR según el análisis de microarrays. El ARN mensajero purificado de las líneas de macrófago inmortalizadas 3FLAG-LXR α y 3FLAG-LXR β , tratadas previamente con el agonista y antagonista sintéticos durante 24 horas, fue analizado con chip de ADN (microarrays). El cambio en la expresión de los genes diana de LXR publicados se muestra expresado como el ratio ante agonista (GW3965) frente a antagonista (GW233). Se representan 3 categorías de expresión con distintas tonalidades de rojo, según la magnitud del cambio. Los valores de corte que definen las tres categorías establecidas son: magnitud de cambio en la expresión mayor o igual a 2 (rojo intenso), entre 1,5 y 1,9 (marrón) e inferior a 1,5 (beige).

La relevancia de la magnitud de cambio en la expresión génica con respecto a las referencias establecidas fue analizada como se detalla a continuación. La categoría que se analizó con mayor profundidad comprende los genes cuyo cambio de expresión es mayor o igual a 2. Aquellos genes con expresión moderadamente significativa, comprendida entre 2 (valor no inclusive) y 1,5 no fueron examinados en profundidad. Finalmente, se considera sin cambio relevante la expresión comprendida entre 1,5 y 0,5 ambos no inclusive siendo este el grupo más numeroso (Fig. 8). Únicamente se tuvieron en cuenta los valores de expresión génica inferiores a 0,5 (incluyendo este valor) en el caso del grupo de análisis número 6: expresión de la línea 3FLAG-LXR β frente a 3FLAG-LXR α , ya que equivale a los genes expresados con magnitud superior a 2 veces en la línea 3FLAG-LXR α con respecto a la línea 3FLAG-LXR β . Por lo tanto el grupo número 7 de análisis se deriva del número 6, simplemente invirtiendo los valores relativizados de expresión (Fig. 8C).

Cada categoría descrita para los transcritos de microarrays se representa en el diagrama de sectores siguiendo un código de color según su magnitud de expresión (ver Fig. 8): desde el rojo intenso para la categoría de expresión (≥ 2), rojo apagado para la categoría de expresión moderada (entre 2 y 1,5), azul para la categoría más numerosa con magnitud de expresión no relevante y amarillo para la categoría con expresión relativizada inferior a 0,5.

La elección de los grupos de comparación indicados ofrece un resultado que caracteriza por un lado, la expresión génica de las líneas que expresan uno de los receptores LXR con respecto a un genotipo control que no cuenta con expresión LXR, ambas bajo condiciones de activación farmacológica del receptor LXR con el agonista GW3965. Por otro lado, la comparación de las líneas que expresan LXR en presencia de un tratamiento con el antagonista GW233, que bloquea la acción transcripcional de este receptor, aun estando presente cada una de las dos proteínas.

Siguiendo la clasificación expuesta anteriormente, como control de validación de los tratamientos farmacológicos, se analizó la expresión correspondiente a la línea LXR DKO en presencia de GW3965 con respecto a GW233 (grupo de análisis 1). A priori, este análisis debe darnos la bondad de nuestra aproximación, ya que la línea LXR DKO, carente de LXR, no debería responder (o tal vez mínimamente de manera inespecífica) a ninguno de los tratamientos farmacológicos específicos de LXR. El resultado arrojó una pequeña lista de tan solo 18 genes de entre todo el genoma, que vieron su expresión sometida a cambios poco significativos frente a los tratamientos (datos no mostrados), lo cual indica que los tratamientos farmacológicos presentan muy pocos efectos independientes de LXR.

Resultados

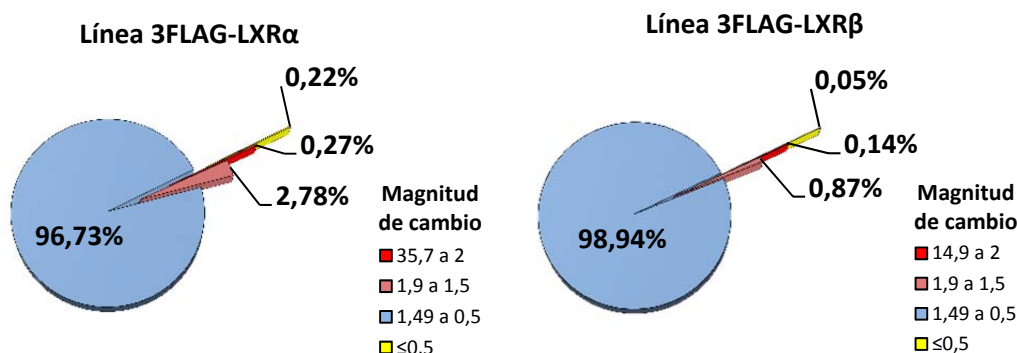
En el caso de la expresión de la línea 3FLAG-LXR α en presencia de GW3965 en relación a la expresión con GW233 (grupo de análisis 2) encontramos 63 genes (0,27% de los genes totales del análisis) (Fig. 8A) con una magnitud de cambio en su expresión máxima de 35,7 encabezada por el gen diana clásico *Abcg1* (Fig. 7 y Tabla I).

En el grupo de análisis 3, la expresión de la línea 3FLAG-LXR β en presencia del agonista y antagonistas de LXR, encontramos 34 genes (0,14% de los genes de este análisis) (Fig. 8B y Tabla II) que aumentan en presencia del agonista GW3965 con respecto a la expresión con el antagonista GW233. Asimismo, esta lista está encabezada por un gen diana clásico, *Abca1*, con una magnitud de cambio de 14,9 (Fig. 7).

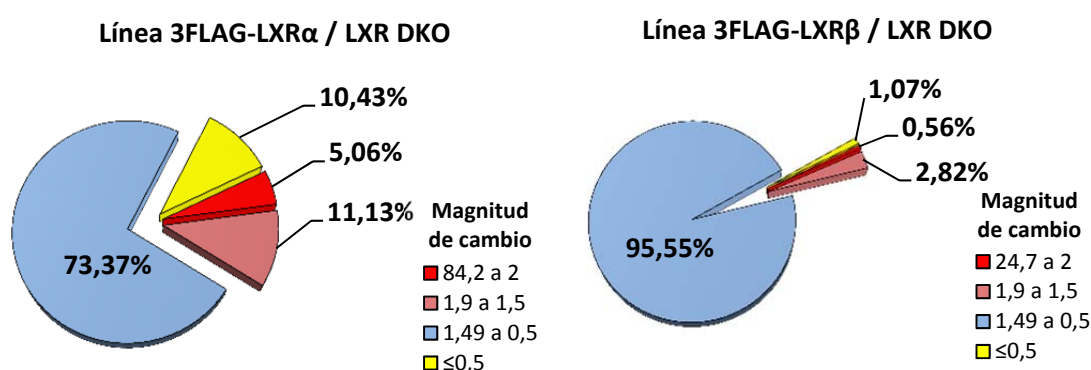
Se apreció un aumento considerable en el número de transcritos al relativizar la expresión de las líneas 3FLAG-LXR α y 3FLAG-LXR β con el genotipo carente de expresión del receptor, LXR DKO (Fig. 8B) (Tablas III y IV). La línea 3FLAG-LXR α aumentó de 0,27% a 5,06% (18,5 veces más) y la línea 3FLAG-LXR β aumentó de 0,14% a 0,56% (4 veces más) (grupos de análisis 4 y 5 respectivamente).

En cuanto a la comparación de la expresión entre las líneas 3FLAG-LXR β frente a 3FLAG-LXR α , un 10,03% de los transcritos (2.348 genes) (Tabla V) que responden al tratamiento con GW3965 tienen una expresión más elevada en la línea 3FLAG-LXR β con respecto a la línea 3FLAG-LXR α (Fig. 8C). La situación a la inversa, en la que predomina la expresión en la línea 3FLAG-LXR α en comparación con la línea 3FLAG-LXR β , destaca aproximadamente la mitad de ese número (4,77% que representan 1.116 transcritos) (Tabla VI).

A Cambios de expresión génica con los tratamientos farmacológicos



B Cambios de expresión génica en referencia a LXR DKO



C Cambios de expresión génica: comparativa entre las líneas 3FLAG-LXR α y 3FLAG-LXR β

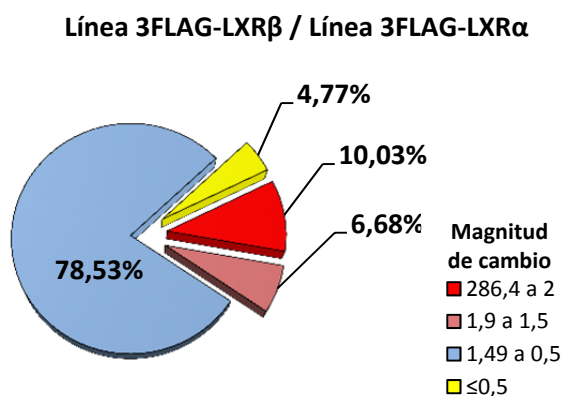


Figura 8. Clasificación de todos los transcritos del análisis de microarrays en categorías de expresión según la magnitud de cambio. Los transcritos analizados por el chip de ADN GeneChip® Mouse Gene 2.0 ST de Affymetrix en las líneas de macrófago inmortalizadas fueron clasificados en categorías según la magnitud de cambio en su expresión con respecto a las referencias indicadas en cada caso: agonista (GW3965) frente a antagonista de LXR (GW233) (A), expresión de las líneas celulares inmortalizadas con respecto a la línea inmortalizada control carente de receptores LXR (LXR DKO) (B) y líneas celulares de expresión del receptor LXR una con respecto a la otra (sectores rojo y amarillo) (C).

2.1. Análisis de la expresión génica en las líneas inmortalizadas de macrófago con herramientas bioinformáticas.

2.1.1. Cambios transcripcionales dependientes de ligando de LXR.

Para ahondar en el conocimiento en las funciones biológicas en las que se encuentran implicados los transcritos expresados de manera significativa por cada una de las líneas celulares, así como encontrar un significado biológico a la funcionalidad de cada receptor LXR en la biología del macrófago, se emplearon una serie de herramientas bioinformáticas. Primeramente se tomaron los números de acceso identificativos de los transcritos resultantes en cada grupo de análisis, que con las referencias correspondientes, destacaran con una expresión relevante, definida previamente como magnitud de cambio en su expresión de valor igual o mayor a 2. Se emplearon estos números debido a que un número no despreciable de sondas de los microarrays presentaba una pobre anotación al genoma del ratón, y por tanto en ellos no figuraban los símbolos oficiales de dichos transcritos. El número de acceso identificativo de esas sondas de microarrays se convirtió al equivalente en símbolo oficial del gen con la página web <https://biobnet-abcc.ncifcrf.gov/db/db2db.php> antes de proceder al análisis de las categorías funcionales. Algunas sondas de los microarrays, sin embargo, codifican regiones genómicas que se corresponden con pseudogenes, transcritos no anotados, micro-ARNs o incluso regiones no codificantes, por lo que no se tuvieron en cuenta en nuestros análisis posteriores, si bien en un futuro pueden retomarse de nuevo. Es por ello que existe un pequeño desfase en cuanto a número de transcritos a los que se refieren las categorías de expresión (Fig. 8) y número de genes considerados en análisis ulteriores.

El análisis de las funciones biológicas en las que están implicados los genes con expresión significativa en ambas líneas celulares con el tratamiento farmacológico se realizó con herramientas bioinformáticas, como el software DAVID 6.7. El análisis reveló que existen algunas diferencias entre los grupos de genes controlados transcripcionalmente por LXR α y LXR β (Fig. 9). Así como la mayoría de las funciones identificadas por el programa son comunes a ambas líneas, se distingue un papel de los genes en la línea 3FLAG-LXR α relacionado con la unión al ADN, la transcripción y la señalización a través de receptores acoplados a proteínas G. En contraposición a ello, existe una mayor implicación de LXR β en la transcripción de genes involucrados con el metabolismo y transporte lipídicos y la respuesta aguda inflamatoria e inmunitaria.

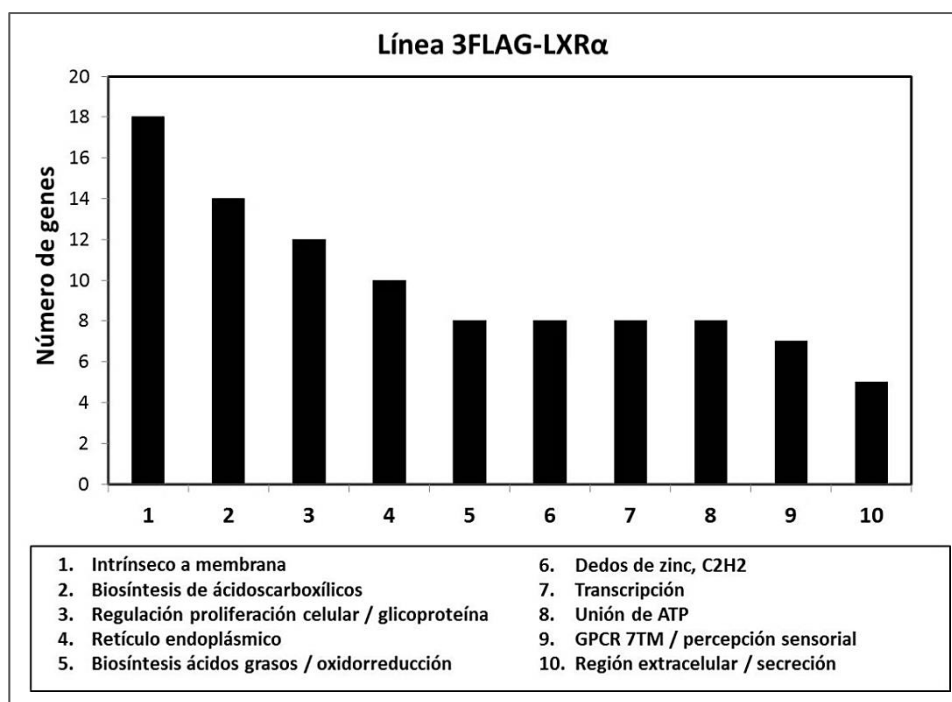
<u>Línea celular 3FLAG-LXRα</u>	<u>Línea celular 3FLAG-LXRβ</u>
1. Biosíntesis de ác.grasos / oxidorreducción	1. Biosíntesis de ác.grasos / unión de iones
2. Unión de ATP	2. Unión de ATP
3. Intrínseco a membrana	3. Intrínseco a membrana
4. Glicoproteína / linaje hematopoyético / regulación de proliferación celular / interacción citoquina-receptor	4. Glicoproteína
5. Biosíntesis de ác.carboxílicos / unión iones metálicos	5. Proceso metabólico lipídico
6. Retículo endoplásmico	6. Flujo de colesterol / transporte lipídico
7. Dedos de zinc	7. Proceso metabólico de esteroides
8. Transcripción	8. Respuesta inflamatoria aguda
9. Región extracelular / secreción	9. Producción de citoquinas / respuesta inmunitaria
10. Señalización GPCR, rhodopsina / percepción sensorial	

Figura 9. Funciones biológicas de los genes regulados por los tratamientos farmacológicos GW3965 y GW233 en cada línea inmortalizada de macrófago. Los genes cuya expresión cambia en respuesta a los tratamientos farmacológicos en magnitud mayor o igual a 2, fueron clasificados con la herramienta bioinformática DAVID 6.7, que identifica las funciones biológicas en las que participan grupos de genes. En azul se presentan aquellas funciones desempeñadas de forma preferente en la línea inmortalizada 3FLAG-LXR α y en naranja las específicas de la línea 3FLAG-LXR β .

Las categorías mencionadas que destacan preferentemente en la línea 3FLAG-LXR α están representadas por numerosos genes de forma general (Fig. 10A). En la línea 3FLAG-LXR β la categoría propia más numerosa cuenta con 12 genes, es el caso de la respuesta inflamatoria aguda, pero en la mayoría de ellas, a diferencia de la línea 3FLAG-LXR α , logran categorizarse pocos genes (Fig. 10B).

Un examen más conciso de la identidad de los genes que componen las distintas categorías funcionales atribuidas a los genes de la línea 3FLAG-LXR β revela que dentro de las clasificaciones “Respuesta inflamatoria aguda” y “Producción de citoquinas / respuesta inmunitaria” aparecen tres genes: *Orm-3* (o alfa-1-glicoproteína ácida-3), perteneciente a la familia de las lipocalinas, así como los genes *Lbp* e *Il-1 α* , que también comparten junto con *Orm-3* la categoría de “Glicoproteína”. Así como el gen *Il-1 α* tiene una expresión común con la línea 3FLAG-LXR α y se engloba dentro de las funciones “Glicoproteína / linaje hematopoyético / regulación de proliferación celular / interacción citoquina-receptor”, los otros dos genes *Orm-3* y *Lbp* son regulados exclusivamente por la línea 3FLAG-LXR β . Representan un grupo interesante de genes por las funciones en las que están involucradas, directamente relacionadas con la biología del macrófago y por su tipo de regulación.

A



B

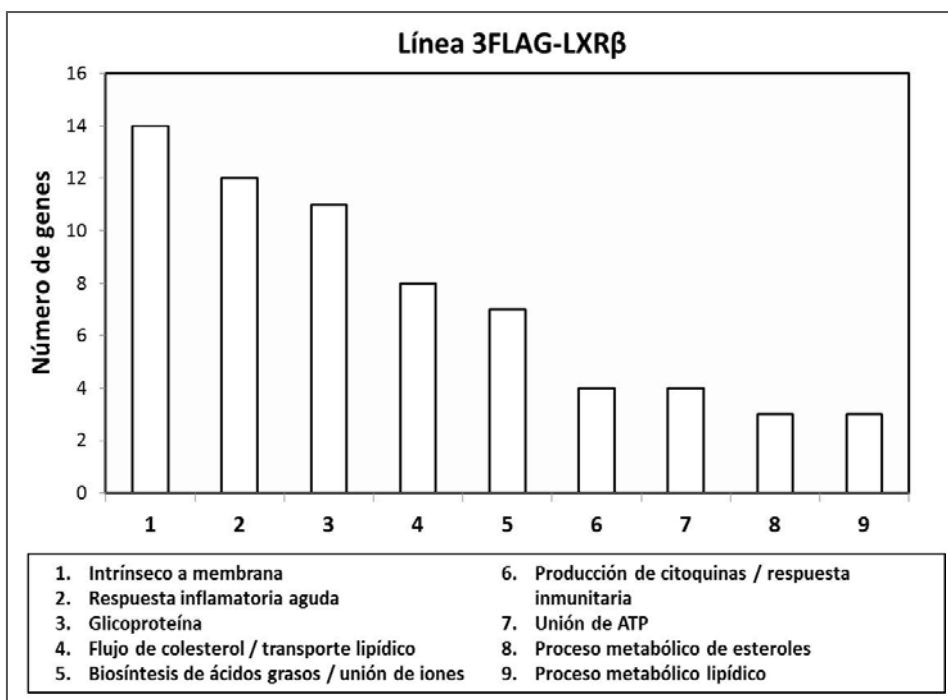


Figura 10. Número de genes que componen las categorías funcionales reguladas en las líneas celulares 3FLAG-LXR α y 3FLAG-LXR β por los tratamientos farmacológicos. Los genes con magnitud de cambio en su expresión definida como relevante (mayor o igual a 2) en presencia del agonista (GW3965), relativizado a la expresión con el antagonista de LXR (GW233), en las líneas inmortalizadas de macrófago 3FLAG-LXR α (63 genes) (A) y 3FLAG-LXR β (34 genes) (B), fueron clasificados con la herramienta bioinformática DAVID 6.7 según la función biológica en la que están implicados.

A continuación se plantea la cuestión de qué número de genes con expresión relevante bajo el tratamiento con GW3965 con respecto a GW233 son de expresión común y preferente de cada línea celular inmortalizada. Para averiguarlo se seleccionaron los genes con una magnitud de expresión relevante (63 en 3FLAG-LXR α y 34 en 3FLAG-LXR β respectivamente) y se analizaron con el software R-Studio para identificar los genes comunes a ambas líneas. El resultado fueron 9 genes diana conocidos entre los que se encontraban además los genes de la interleuquina-1 α y la lisofosfatidilcolina:acil-CoA-aciltransferasa (*Lpcat3*) (Sallam et al. 2014) (Rong et al. 2013) (Fig. 11).

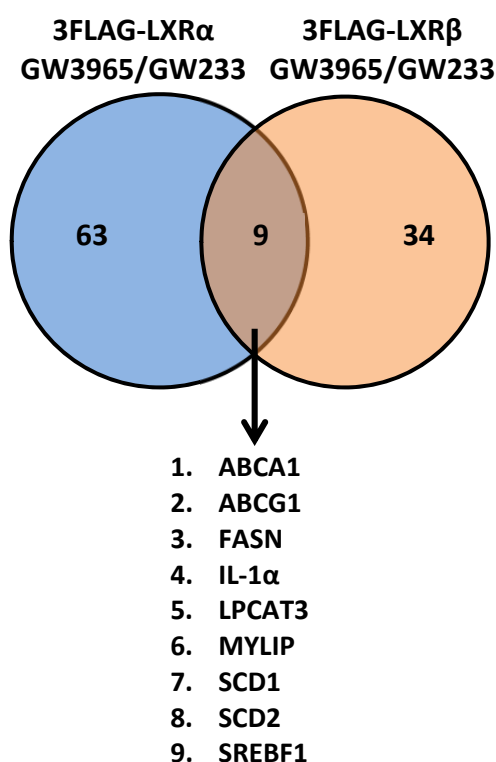


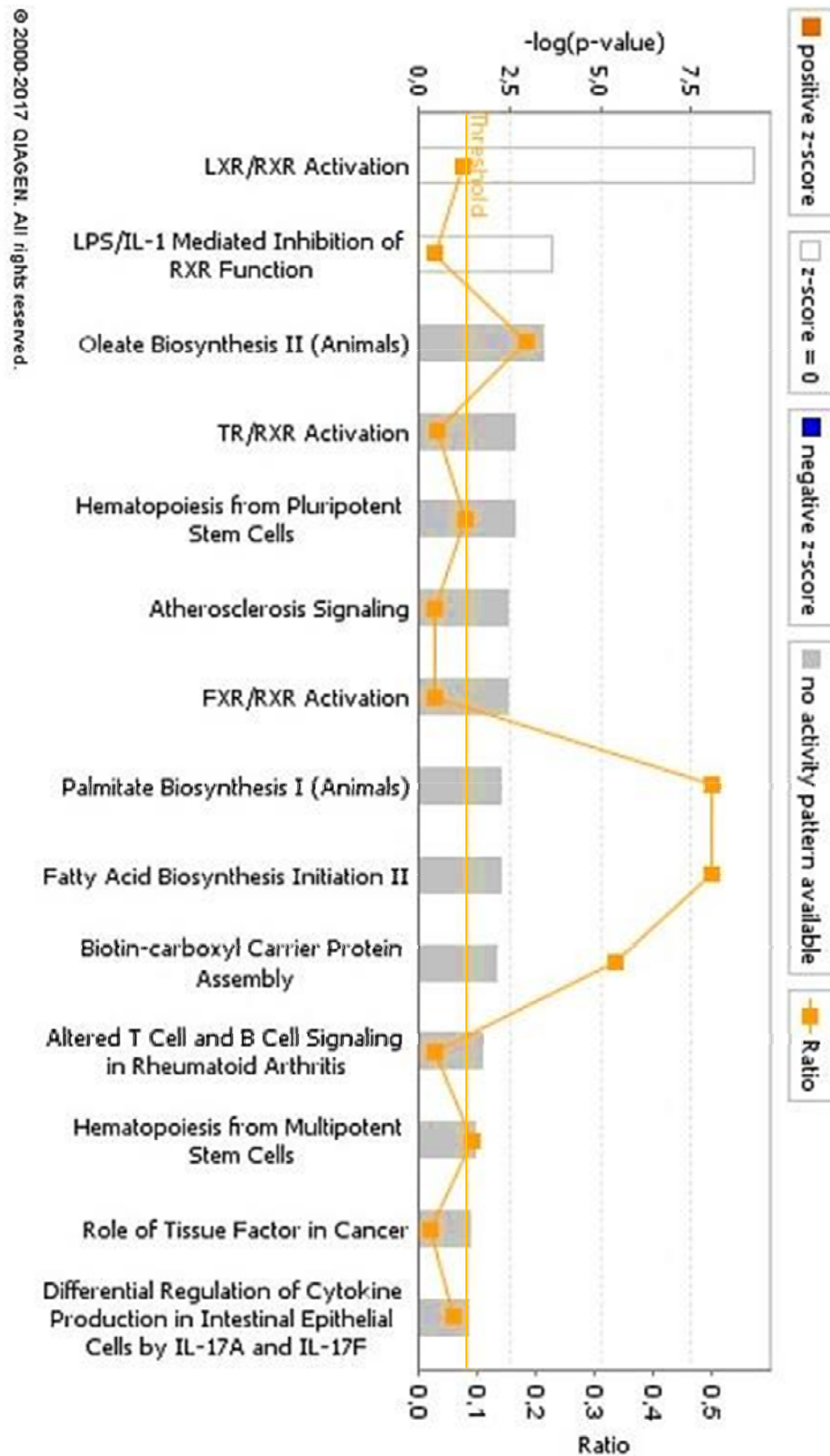
Figura 11. Número de genes de expresión común y diferencial en las líneas inmortalizadas de macrófago 3FLAG-LXR α y 3FLAG-LXR β . Los genes con magnitud de cambio en su expresión mayor o igual a 2 en presencia del agonista (GW3965) relativizado a la expresión con el antagonista de LXR (GW233) en las líneas celulares 3FLAG-LXR α y 3FLAG-LXR β fueron interrogados con el programa R-Studio. De entre ellos 9 genes son expresados de manera simultánea por ambas líneas celulares bajo estas condiciones.

Resultados

Adicionalmente se hizo uso del software Ingenuity® Pathway Analysis (IPA®) para un análisis más exhaustivo de los datos obtenidos por microarrays. Este novedoso programa ha surgido para el estudio de datos “ómicos”, generados con técnicas de secuenciación de última generación, así como para el estudio de la expresión génica y secuenciación de ARN. Con este programa se identificaron 14 rutas biológicas en las que interviene la línea 3FLAG-LXR α y 36 en la línea 3FLAG-LXR β , de las cuales se muestran 18 (Fig. 12A y B). La mayoría de las rutas resultaron ser comunes a ambas líneas, como la activación de la ruta LXR/RXR y TR/RXR, biosíntesis de ácidos grasos y palmitato (*oleate biosynthesis*, *palmitate biosynthesis*) y la participación en cascadas de señalización en el contexto de enfermedades como la aterosclerosis o la artritis reumatoide.

Sin embargo, también se han identificado algunas funciones propias de cada una de las líneas celulares: en la línea 3FLAG-LXR α se destacan la hematopoyesis a partir de células pluripotentes y multipotentes (categorías en las que intervienen *CSF1*, así como *Il-1 α* en el primer caso), la intervención en la síntesis de ácidos grasos (*biotin-carboxyl carrier protein assembly*), señalización en el contexto del cáncer (en la que se encuadran *CSF1* y el proto-oncogén *Fgr*) y la regulación de la producción de citoquinas (Fig. 12A).

A



B

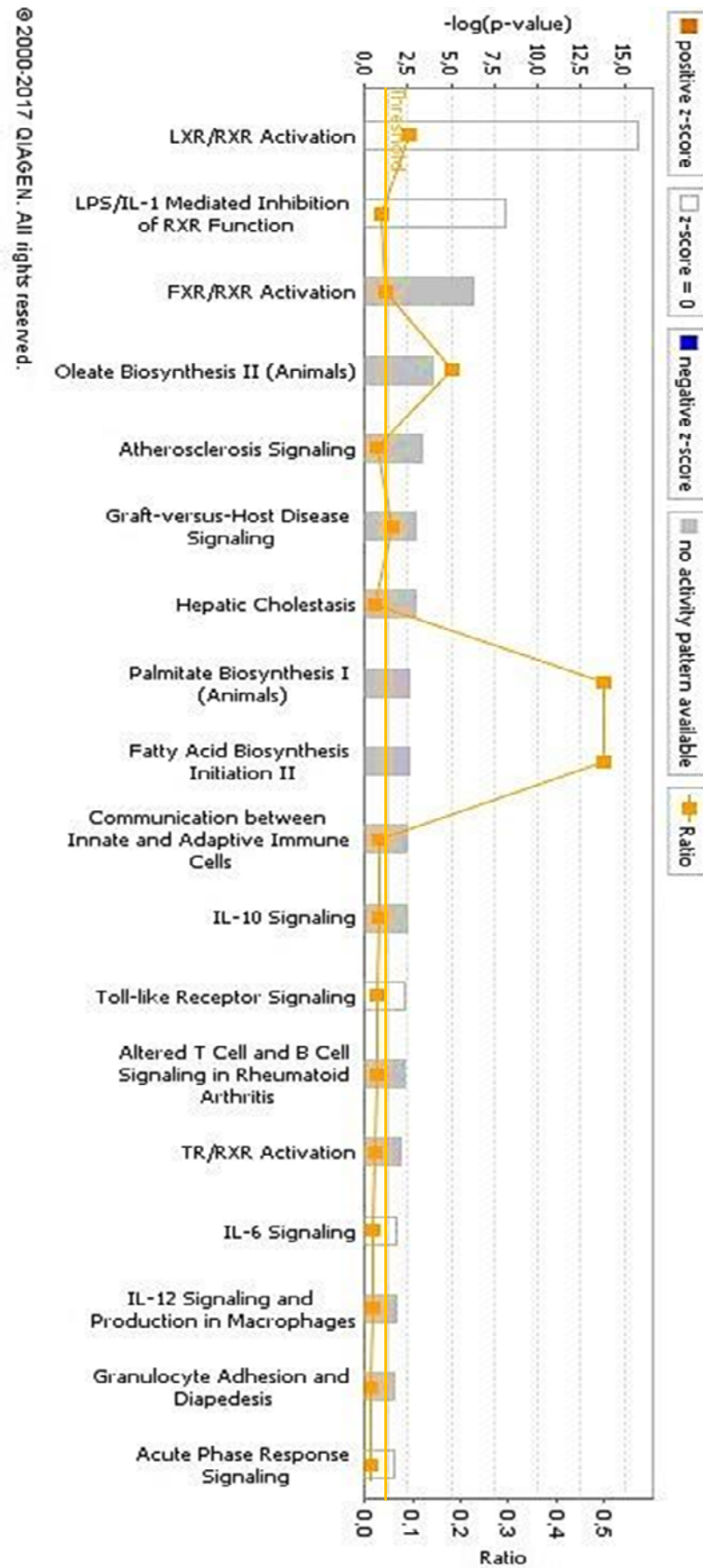


Figura 12. Vías de señalización celular en las que intervienen los genes expresados diferencialmente en las líneas 3FLAG-LXR α y 3FLAG-LXR β con los tratamientos farmacológicos, según el análisis de Ingenuity Pathway Analysis®. Los genes cuya expresión cambia en magnitud mayor o igual a 2 en presencia del agonista (GW3965), relativizado a la expresión con el antagonista (GW233), en las líneas 3FLAG-LXR α (A) y 3FLAG-LXR β (B) fueron analizados con el software IPA®. El valor de umbral (*threshold*), representado como una línea continua en el gráfico, tiene un valor fijado por defecto en 1,3 y equivale a $(-\log(p\text{-valor}))$ siendo el p-valor 0,05. El valor de *ratio* equivale al número de genes obtenidos con nuestros análisis que están incluidos en una ruta, con respecto al número de genes que caracterizan dicha ruta. El color de las barras se correlaciona con el valor de *z-score*, que representa la predicción realizada por IPA® en cuanto a inhibición o activación de la ruta, basado en la información en la que se fundamenta el programa. Se muestran todas las rutas de señalización identificadas por el software en la línea 3FLAG-LXR α y las 18 más relevantes de la línea 3FLAG-LXR β de un total de 36.

De aquellas funciones biológicas atribuidas a la línea 3FLAG-LXR β (Fig. 12B), no comunes con la línea 3FLAG-LXR α se incluyen principalmente una variedad de rutas relacionadas con el funcionamiento del sistema inmunitario, como la señalización en la enfermedad de injerto contra huésped, comunicación entre la inmunidad innata y adaptativa (en la que se encuentran los genes *Il-1 α* y el receptor del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I, *HLA-A*), señalización por IL-10, IL-12, IL-6 y TLR, funciones de adhesión y diapédesis de granulocitos y la respuesta de fase aguda, ya identificada previamente por el programa DAVID 6.7, en la que figuran *Lbp*, *Il-1 α* y *Orm-3*.

Se profundizó más en la naturaleza de las interacciones existentes entre las proteínas Orm con otras proteínas, moléculas y compuestos (tanto naturales como sintéticos), con la función de análisis de redes de interacciones (*Interaction Network*) que establece el software IPA® (Fig. 13).

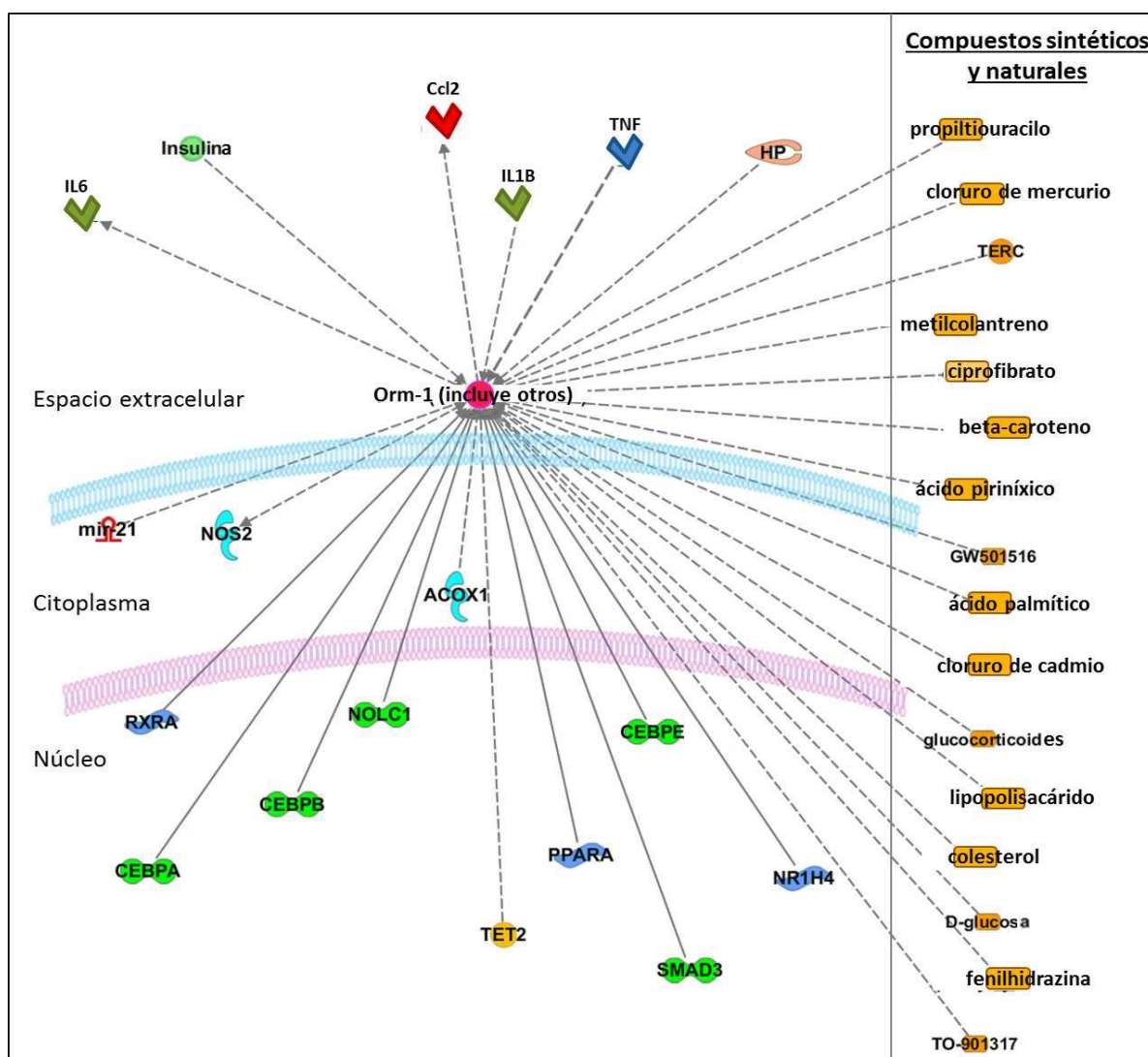


Figura 13. Resumen gráfico de las interacciones descritas entre el grupo de proteínas de la familia *Orm* (*Orm-1*, *Orm-2* y *Orm-3*) con diversas moléculas, proteínas y compuestos sintéticos. Las interacciones previamente caracterizadas entre las proteínas de la familia *orosomucoide* (o alfa-1-glicoproteínas ácidas) con otras moléculas o compuestos fueron representadas con el software Ingenuity® Pathway Analysis (IPA®) dentro del compartimento celular en el que tienen lugar. Las flechas de línea continua representan interacciones directas y las líneas discontinuas interacciones indirectas.

2.1.2. Análisis de expresión génica dependiente de LXR α o LXR β con respecto a la línea LXR DKO.

Del análisis de la expresión de la línea 3FLAG-LXR α con respecto a la línea LXR DKO (grupo de análisis 4) se identificaron 1.114 genes con una magnitud de cambio igual o superior a 2, lo que ofrecía una clasificación con DAVID 6.7 de más de 260 categoría funcionales. Ante ese volumen inmanejable de datos obtenidos fue necesario sintetizar la lista de genes de una forma lógica sin sesgar la composición génica en esencia innecesariamente. Para ello examinamos todos los genes relevantes del análisis en una representación gráfica en función de la distribución de su expresión como magnitud de cambio. Observamos que la magnitud de cambio está comprendida entre 84,2 y 2, estando la mayoría de los genes (932 genes, 83,6% del total) distribuidos por debajo de una magnitud de 5. Decidimos centrar nuestro análisis en los genes más fuertemente expresados con magnitud entre 5 y 84,2 que correspondían a 182 genes (16,3% del total), un número que no difería mucho de los analizados a continuación en la línea 3FLAG-LXR β (grupo de análisis 5).

Las funciones en las que destaca la línea 3FLAG-LXR α sobre la línea de genotipo LXR DKO son variadas e incluyen casi todas las categorías previamente identificadas en el análisis de la línea frente a los tratamientos farmacológicos. A ellas se suman entre otras funciones: implicación en el metabolismo lipídico, transcripción, transporte de iones, respuesta inmunitaria, apoptosis, hemostasis, quimiotaxis, defensa antivírica, división celular y señalización en varias rutas como la ruta Wnt, Jak-STAT, PI3K-Akt o la ruta de los receptores de tipo *toll*. Estas moléculas cuentan con actividades quinasa, fosfatasa, peptidasa, transferasa, oxidorreductasa y sus dominios más característicos son inmunoglobulina, SH2 (*Src homology 2*), de cremallera de leucinas y lectina tipo C. (Fig. 14A). Sin embargo, algunas categorías no figuran exactamente bajo el mismo nombre, aunque sí aparecen otras que reflejan funciones parecidas (por ejemplo, la categoría “Biosíntesis de ácidos grasos” que resultaba en el análisis de la línea 3FLAG-LXR α con los tratamientos farmacológicos ahora no figura, pero sí la categoría “Metabolismo lipídico”).

El análisis de la expresión de la línea 3FLAG-LXR β con respecto a la línea LXR DKO (grupo de análisis 5), estableciendo como punto de corte una magnitud de expresión de 2, incluía 123 genes con expresión máxima de 24,7 frente a LXR DKO. Las funciones biológicas en las que están implicados los genes (25 categorías encontradas con DAVID 6.7) comprenden casi todas las categorías resultantes del análisis con los tratamientos farmacológicos y también coinciden con 11 categorías halladas en la línea 3FLAG-LXR α frente a LXR DKO (Fig. 14A y B, en negrita). Entre estas 11 funciones comunes se encuentran: relacionadas con la actividad de enzimas quinasa, unión al ADN a través del dominio de cremallera de leucinas, así como la transcripción, unión a membrana, funciones asociadas a la fracción de membrana exterior (glicoproteína), metabolismo lipídico, funciones del retículo endoplásmico y unión de iones metálicos. Como funciones exclusivas se destacan las funciones ligasa y endopeptidasa, unión celular a través de cadherinas, funciones relacionadas con el sistema mayor de histocompatibilidad II (enfermedad de injerto contra huésped, EICH), el fagosoma, la diferenciación celular y como ya apareció en el análisis de la expresión de esta línea tratada con agonista y antagonista, la respuesta inmunitaria. Esta última categoría se muestra claramente relacionada con la familia de las alfa-1-

glicoproteínas ácidas y su función principal, la respuesta inmunitaria de fase aguda. Esta vez en esta categoría encontramos los tres componentes de la familia orosomucoide, *Orm-1*, *Orm-2* y *Orm-3*, así como *Lbp* e *Il-1 α* (Fig. 14B, categoría número 15).

Comunes a ambas líneas frente a LXR DKO figuran sólo 11 genes, con funciones variadas entre las que se destacan la respuesta antivírica (*Ifi2712a*, *Ifi44*, *Isg15*), el metabolismo lipídico (*Scd1*, *Srebf1*, *Mylip*, *Sesn2*), participación en diversas cascadas de señalización celular como Nf κ B (*Tifab*) y otras (*Vegfa*, *Pdgfra*, *Sema4a*, *Scimp*, *Pros1*, *Klk8*), funcionalidad de células T (*Ripk3*, *Trem12*), GTPasas (*Gtpbp3*, *Adssl1*, *Rab27a*), transportadores de solutos (*Slc7a7*) y otros miembros de los que no se conoce la función, pero se sabe que están integrados en la membrana (B430306N03Rik, C130050O18Rik, *Them6*).

Encontramos 14 genes de expresión común en la línea 3FLAG-LXR α , en respuesta al tratamiento con GW3965 y GW233, que también se expresan de forma destacable respecto a la línea LXR DKO, estableciendo para ambos análisis un punto de corte mayor o igual a 2 en la magnitud de expresión génica. Aparte de los conocidos genes diana de LXR (*Mylip*, *Scd1* y *Srebf1*, *Lpcat3*, enzima implicada en el remodelamiento de fosfolípidos) se encuentran también *Scd3* que pertenece a la misma familia de enzimas que *Scd1* y *Scd2*, los receptores olfatorios *Olfr763* y *Olfr706*, el transportador transmembrana *Slc6a21* (miembro de la familia de transportadores de solutos), *Slfn5* relacionado con el control del crecimiento celular en carcinoma de riñón, la tirosina quinasa *Fgr* de la familia Src, el gen implicado en el desarrollo de los ovarios, *Ccdc182*, el antígeno menor de histocompatibilidad *H28* (también llamado *Ifi44l*), el gen que codifica la proteína con dedos de zinc *Zfp608* y *Trav6-3*, la variante 3 de la cadena alfa del receptor de antígeno de células T.

En la misma comparación considerando la expresión en la línea 3FLAG-LXR β bajo los tratamientos o la línea carente de expresión de receptores LXR encontramos 16 genes, entre los que se encuentran 9 genes diana conocidos de LXR (*Abcg1*, *Acs13*, *Arl4c*, *Apoc2*, *Apoe*, *Mylip*, *Fasn*, *Scd1*, *Srebf1*), los genes encontrados anteriormente regulados exclusivamente por LXR β (*Lbp* y *Orm-3*), el gen regulado también por la línea 3FLAG-LXR α , *Il-1 α* ; *Trem12* relacionado con la activación de las células T, *Mfsd2a* relacionado con el transporte lipídico, *Eepd1* (miembro de la familia que contiene un dominio endo/ exonucleasa/fosfatasa) y *Abi3*, relacionado con la motilidad celular.

A

Funciones biológicas asociadas a cambios transcripcionales en la línea 3FLAG-LXR α

1. Actividad proteína quinasa	20. Anclaje por glicofosfatidilinositol
2. Unión de ATP	21. Apoptosis
3. Dominio inmunoglobulina	22. Citoquina / interacción citoquina-receptor
4. Dominio SH2	23. Citosol
5. Enlace disulfuro / señalización	24. Coagulación sanguínea / hemostasis
6. Glicoproteína	25. Defensa antivírica
7. Transmembrana / componente integral de membrana	26. División celular
8. Metabolismo lipídico	27. Glutación S-transferasa
9. Región extracelular	28. Inmunidad innata / respuesta inflamatoria
10. Dominio de cremallera de leucinas	29. Lectina tipo C
11. Retículo endoplásmico	30. Oxidorreductasa
12. Transcripción / unión ADN	31. Quimiotaxis
13. Transporte de iones	32. Regulación de proliferación celular
14. Unión de iones metálicos	33. Ruta de señalización AMP cíclico
15. Membrana plasmática basolateral	34. Ruta de señalización PI3K-Akt
16. Actividad de citoquinas / respuesta a LPS	35. Ruta de señalización Wnt
17. Actividad del inhibidor de cisteína endopeptidasas	36. Ruta de señalización JAK-STAT
18. Actividad fosfatasa	37. Señalización por receptores tipo <i>toll</i>
19. Actividad peptidasa	38. Transferasa
	39. Unión celular

B

Funciones biológicas asociadas a cambios transcripcionales en la línea 3FLAG-LXR β

1. Dominio catalítico de tirosina-proteína quinasa / unión de ATP
2. Dominio inmunoglobulina
3. Dominio SH2
4. Glicoproteína / enlace disulfuro / señalización
5. Membrana / transmembrana
6. Metabolismo lipídico
7. Región extracelular / secreción
8. Repetición rica en leucina (LRR)
9. Retículo endoplásmico
10. Transcripción
11. Unión de iones metálicos
12. Dedos de zinc
13. Unión hemo / iones de hierro
14. Actividad oxidoreductasa
15. Alfa-1-glicoproteína / respuesta de fase aguda
16. Diferenciación celular
17. Ligasa
18. Complejo mayor de histocompatibilidad-II / EICH / fagosoma
19. Monooxigenasa
20. Receptor acoplado a proteínas G (GPCR)
21. Regulación positiva de angiogénesis
22. Transporte lipídico
23. Unión cadherina (unión célula-célula)
24. Unión de GTP
25. Zimógeno / actividad de serina endopeptidasas

Figura 14. Funciones biológicas de los genes expresados diferencialmente en cada línea de macrófago en relación a la expresión en la línea LXR DKO. Los genes con una magnitud de cambio en su expresión mayor o igual a 5 en la línea 3FLAG-LXR α (182 genes) (A) y mayor o igual a 2 en la línea 3FLAG-LXR β (123 genes) con respecto a la expresión en la línea LXR DKO (B) fueron clasificados con la herramienta bioinformática DAVID 6.7 según las funciones biológicas que desempeñan. Se muestra en negrita aquellas funciones comunes a las líneas 3FLAG-LXR α y 3FLAG-LXR β .

2.1.3. Análisis de expresión génica en las líneas 3FLAG-LXR β frente a 3FLAG-LXR α y viceversa.

Se analizaron los genes cuya expresión predominaba en la línea 3FLAG-LXR β sobre la línea 3FLAG-LXR α (grupo de análisis 6) y viceversa (grupo de análisis 7). En el caso de la línea 3FLAG-LXR β sobre la línea 3FLAG-LXR α se regulan 2.237 genes con una magnitud de cambio en su expresión mayor o igual a 2 y en el caso inverso 1.033 genes. Como ya ocurrió anteriormente, se trata de un número de transcritos demasiado elevado para su manejo, por lo que se estableció un punto de corte para seleccionar sólo los genes expresados más fuertemente, con magnitud de cambio igual a 10 para ambas líneas. Este cambio redujo el número de genes a 132 en la línea 3FLAG-LXR β sobre la línea 3FLAG-LXR α y 95 en la línea 3FLAG-LXR α sobre la línea 3FLAG-LXR β .

Un examen de las categorías funcionales en las que se encuadran los genes resultantes del análisis revela que existen algunas en común entre las líneas 3FLAG-LXR α y 3FLAG-LXR β , lo cual sólo es posible si los genes que componen las categorías son diferentes, pero cuentan con la misma función, ya que los análisis son mutuamente excluyentes.

Cabe destacar que muchas de las categorías funcionales ya habían aparecido previamente en los análisis frente a la línea LXR DKO (comparar Fig. 14A con Fig. 15A y Fig. 14B con Fig. 15B). Para profundizar más en esta observación se determinó el número de genes que eran comunes en el análisis de expresión de la línea 3FLAG-LXR α con respecto a la línea LXR DKO (grupo de análisis 4) y al mismo tiempo en la línea 3FLAG-LXR α frente a la línea 3FLAG-LXR β (grupo de análisis 7) con el programa R-Studio. Ampliamos el análisis de forma que en lugar de elegir una magnitud de cambio igual a 5 en el primer caso y 10 en el segundo se tomaron la totalidad de los genes con una magnitud de cambio igual o superior a 2 en ambos casos (1.114 genes y 1.033 respectivamente). Encontramos que 760 genes eran comunes a ambos análisis, lo que supone un 68,2% de los genes del análisis con el genotipo LXR DKO como referencia y un 73,6% de los genes con la referencia de expresión en la línea 3FLAG-LXR β .

Adicionalmente, se analizaron con el software IPA® las rutas de señalización celulares en las que intervienen los genes que tienen una expresión preferente en la línea 3FLAG-LXR α , al establecer una comparativa con la transcripción en la línea 3FLAG-LXR β (Fig. 16A). Asimismo, se identificaron las rutas de señalización preferentes en la línea celular 3FLAG-LXR β , estableciendo la comparación con la actividad transcripcional en la línea 3FLAG-LXR α (Fig. 16B).

A

**Funciones biológicas asociadas a cambios transcripcionales
destacables en la línea 3FLAG-LXR α**

1. Glicoproteína / enlace disulfuro / señalización
2. Inmunidad innata
3. Quimiotaxis/ señalización por receptor acoplado a proteínas G (GPCR)
4. Actividad del inhibidor de cisteína endopeptidasas
5. Ruta de señalización de JAK-STAT / PI3K-Akt
6. Ruta de señalización de MAPK
7. Ruta de señalización de HIF-1
8. División celular
9. Integral a membrana / transmembrana
10. Actividad peptidasa
11. Unión de ATP
12. Regulación positiva de la proliferación celular
13. Regulación de la transcripción / unión a ADN
14. Oxidorreductasa
15. Dominio inmunoglobulina
16. Unión de iones metálicos
17. Transporte de iones

B

**Funciones biológicas asociadas a cambios transcripcionales
destacables en la línea 3FLAG-LXR β**

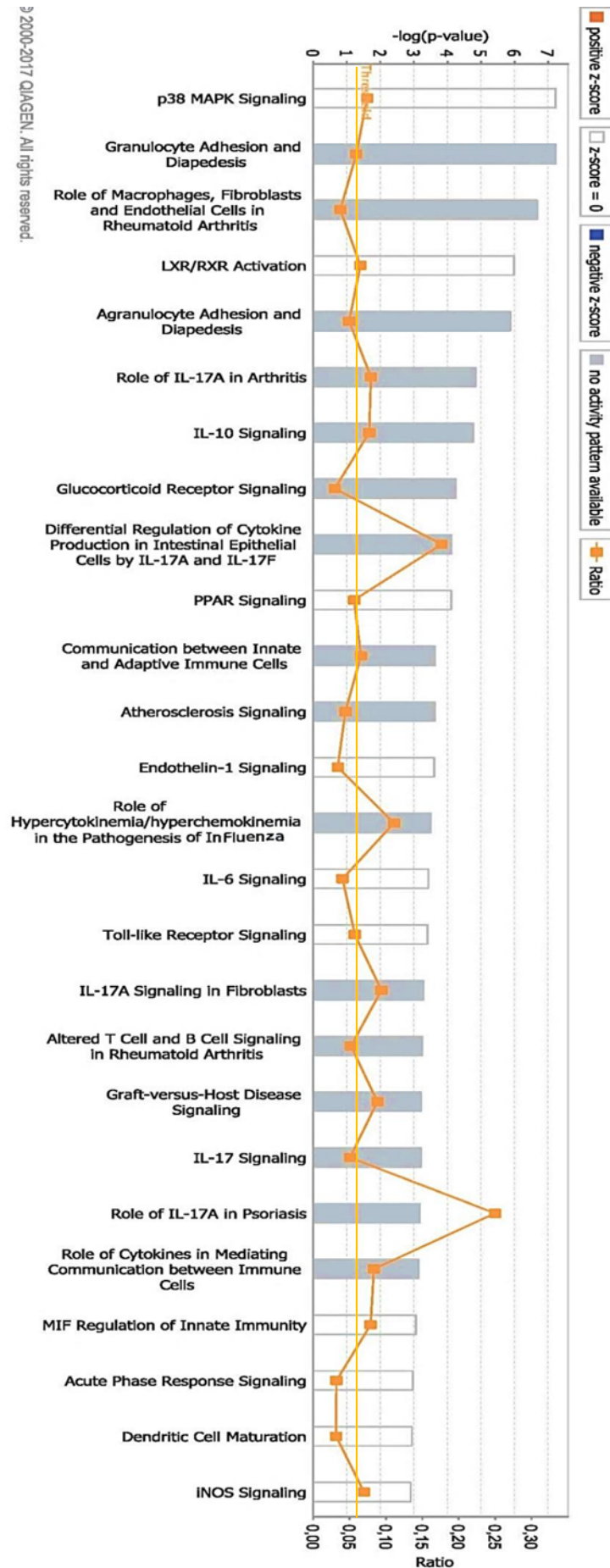
- | | |
|--|--|
| 1. Glicoproteína / enlace disulfuro / señalización | 12. Lipoproteína |
| 2. Factor de coagulación, dominio GLA (rico en gamma-ácido carboxiglutámico) | 13. Ubiquitinación de proteínas |
| 3. Proceso inmunitario / EICH | 14. Fibronectina III |
| 4. Zimógeno / actividad de serina endopeptidasas | 15. Meiosis oocitos |
| 5. Coagulación sanguínea | 16. Ruta de señalización PI3K-Akt |
| 6. Tetraspanina | 17. Ruta de señalización JAK-STAT |
| 7. Lisosoma | 18. Ruta de secreción |
| 8. Unión de iones metálicos | 19. Actividad proteína quinasa |
| 9. Dominio inmunoglobulina | 20. Metabolismo lipídico |
| 10. Dominio similar a EGF (factor de crecimiento epidérmico) | 21. Unión celular |
| 11. Inhibidor de proteasas | 22. Transporte de iones |
| | 23. Unión de ARN (cola poly-A) |
| | 24. Unión a ADN |
| | 25. Retículo endoplásmico |
| | 26. Receptor acoplado a proteínas G (GPCR) |

Figura 15. Funciones biológicas en las que participan los genes expresados destacadamente en la línea celular 3FLAG-LXR α con referencia a 3FLAG-LXR β y viceversa. Los genes con una magnitud de cambio en su expresión mayor o igual a 10 en la línea celular 3FLAG-LXR α (95 genes) con referencia a la expresión detectada en 3FLAG-LXR β (A) y viceversa (132 genes) (B), fueron clasificados según las funciones biológicas que desempeñan con la herramienta bioinformática DAVID 6.7.

Resultados

A

© 2000-2017 QIAGEN. All rights reserved.



Resultados

B

© 2000-2017 QIAGEN. All rights reserved.

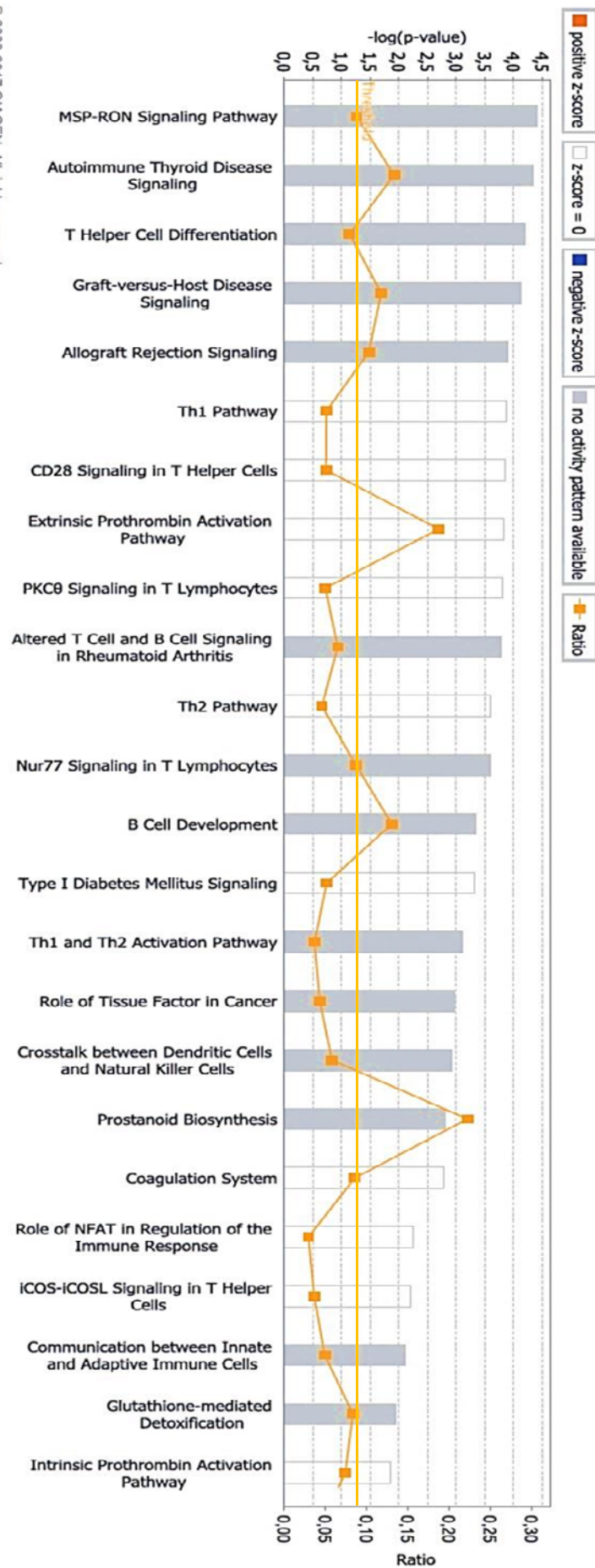


Figura 16. Vías de señalización celular en las que intervienen los genes expresados destacadamente en la línea 3FLAG-LXR α con referencia a la línea 3FLAG-LXR β y viceversa, según el análisis de Ingenuity Pathway Analysis®. Los genes cuya expresión cambia en magnitud mayor o igual a 10 en presencia del agonista (GW3965) en la línea 3FLAG-LXR α (95 genes) con referencia a la expresión detectada en 3FLAG-LXR β (A) y viceversa (de lo que resultaron 132 genes) (B), fueron analizados con el software IPA®. Se muestran 24 categorías de 38 totales en la línea 3FLAG-LXR α y 23 categorías de 81 totales en la línea 3FLAG-LXR β .

Asimismo determinamos el número de genes que eran comunes en el análisis de expresión de la línea 3FLAG-LXR β con respecto a la línea LXR DKO (grupo de análisis 5) y al mismo tiempo en la línea 3FLAG-LXR β frente a la línea 3FLAG-LXR α (grupo de análisis 6) con el programa R-Studio. Tomamos la totalidad de los genes de los análisis (123 y 2.237 respectivamente) y encontramos 67 genes comunes a ambos análisis, lo que supone un 54,5% de los genes del análisis de la línea 3FLAG-LXR β con respecto a LXR DKO y sólo un 3% de los genes que se expresan más en la línea 3FLAG-LXR β con respecto a de la línea 3FLAG-LXR α .

Una representación esquemática que recapitula los resultados obtenidos en cada grupo de análisis realizado sobre los transcritos de microarrays, en cuanto a número de genes controlado transcripcionalmente por cada receptor LXR, se muestra en la figura 17. Se han considerado para la representación el número total de genes de cada análisis, en los que se ha fijado como valor de corte la magnitud de cambio en la expresión igual o mayor de 2.

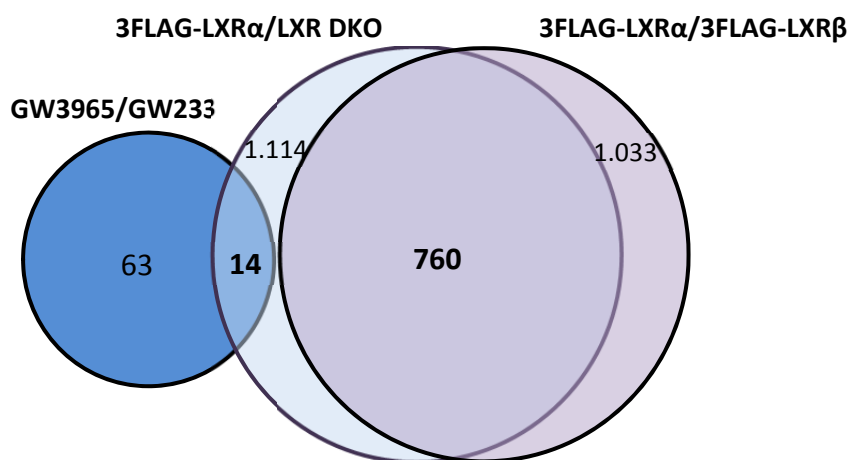
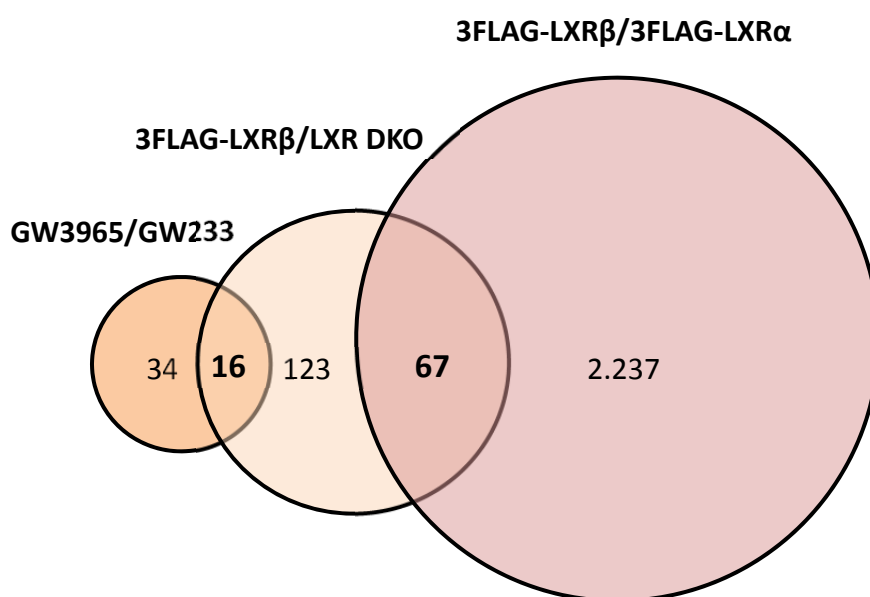
A Número de genes con expresión potenciada en la línea 3FLAG-LXR α .**B Número de genes con expresión potenciada en la línea 3FLAG-LXR β .**

Figura 17. Los grupos de genes controlados transcripcionalmente por LXR α y LXR β bajo las condiciones examinadas en el análisis de microarrays tienen una regulación distintiva. Se representa de forma simplificada el número de genes comunes (negrita) a cada uno de los análisis comparativos de expresión realizados en las líneas celulares 3FLAG-LXR α (A) y 3FLAG-LXR β (B). En este caso el valor de corte de la magnitud de expresión que se ha considerado para definir los genes totales de cada categoría es de igual o mayor de 2.

3. Optimización de la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) para el análisis de las localizaciones genómicas de LXR.

Para determinar las localizaciones de unión en el genoma murino de los receptores LXR α y LXR β se realizó una optimización experimental de la técnica de inmunoprecipitación de cromatina. Inicialmente se optó por aplicar la técnica en dos tipos de células fibroblásticas embrionarias de ratón (MEFs): carentes de expresión de proteínas LXR (LXR DKO) o que por el contrario expresan LXR α y hacer uso de un anticuerpo control y uno que específicamente reconozca la proteína LXR, siendo este el planteamiento más sencillo y claro para comprobar el éxito de la técnica.

Algunos de los aspectos más relevantes que se debían ajustar de esta técnica y que están directamente correlacionados con el tipo celular del que se trate son: tiempo de sonicación para adecuarlo al tamaño de la fragmentación y que sea posible la secuenciación posterior, la posibilidad de congelación de la cromatina de partida en los primeros pasos del protocolo, la correcta purificación y visualización del ADN fragmentado, el número de células máximo que puede procesarse en cada paso, el funcionamiento y capacidad de resolución que ofrecen los distintos anticuerpos específicos y el análisis de los datos con la elección de los controles adecuados.

3.1. Optimización de la sonicación de la cromatina.

Inicialmente realizamos diversas pruebas centradas en conseguir un control sólido de las condiciones de sonicación, variando el número de células de partida, purificando la cromatina por métodos tradicionales o con kits comerciales y visualizando el ADN fragmentado en geles con diferentes porcentajes de agarosa y cantidades de muestra. Primeramente realizamos un escrutinio de tiempos de sonicación material genético de células MEFs para determinar cuál era el tiempo óptimo para este tipo de material de partida.

La sonicación de las células fijadas previamente con formaldehído al 1% producía de forma característica un patrón dividido en dos partes dentro del carril del gel: una parte del material aparentemente tiene dificultad para migrar a lo largo del gel y permanece en la parte superior del mismo y otra parte ha avanzado a la altura de los fragmentos más pequeños, en torno a 200 pares de bases (Fig. 18). Mayor tiempo de sonicación consigue desplazar el material genético hacia la parte más fragmentada, pero estos experimentos, a pesar de resultar prometedores, no resultaron muy informativos en cuanto a qué tiempos son los más óptimos para este tipo celular y cómo podían perfeccionarse las condiciones de sonicación.

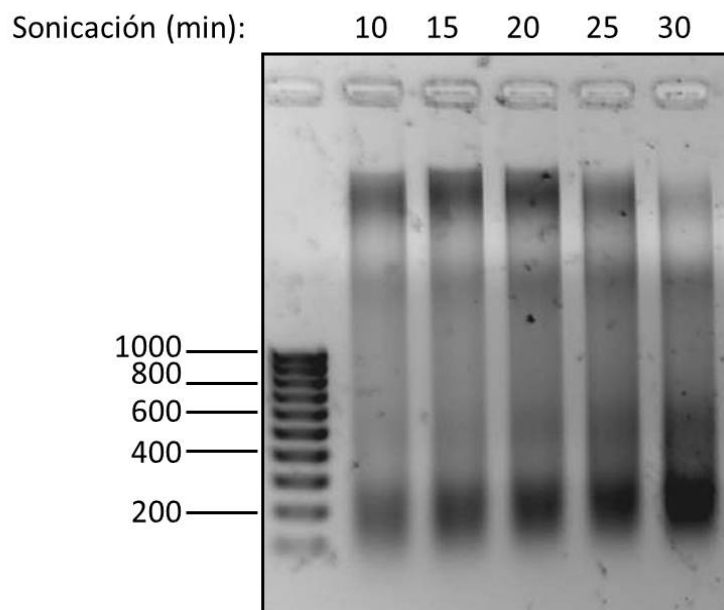


Figura 18. Optimización de la visualización en gel de agarosa de la cromatina sonicada obtenida de células MEFs. 2×10^6 de células MEFs por condición se fijaron con formaldehído 1% y se sonicó su cromatina durante los tiempos indicados. El ADN purificado de la cromatina fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y expuesto a bromuro de etidio para verificar su fragmentación.

3.2. Doble fijación de la cromatina con formaldehído y DSG.

El uso del compuesto DSG (di-N-succinimidilglutarato) en el paso de fijación con el que se inicia la técnica supuso un punto de inflexión importante en los experimentos de inmunoprecipitación de cromatina. Al producir una fijación adicional más robusta a la que se consigue con formaldehído las proteínas quedan más fuertemente adheridas unas a otras y al ADN, mejorándose enormemente la resolución de las bandas de ácidos nucleicos tras la sonicación (Fig. 19) y la recuperación de fragmentos específicos unidos a la proteína de interés, como pudimos comprobar después.

A partir del material fijado con DSG y sonicado a un tamaño de aproximadamente 400 pares de bases realizamos la primera prueba de ChIP con el anticuerpo policlonal que reconoce LXR α/β y un extracto de inmunoglobulinas séricas tipo G de ratón no inmunizado, como control de unión inespecífica del anticuerpo. La amplificación por PCR a tiempo real de las regiones genómicas con cebadores específicos donde se han investigado las uniones de la proteína LXR por otros autores (Heinz et al. 2010) demostró que con respecto a la unión de las inmunoglobulinas control, el anticuerpo específico condujo a un enriquecimiento de fragmentos específicos muy significativo en los lugares de unión de LXR en la vecindad de los genes diana (Fig. 20A).

Resultados

Sonicación (min): 10 20 30 40 50 60

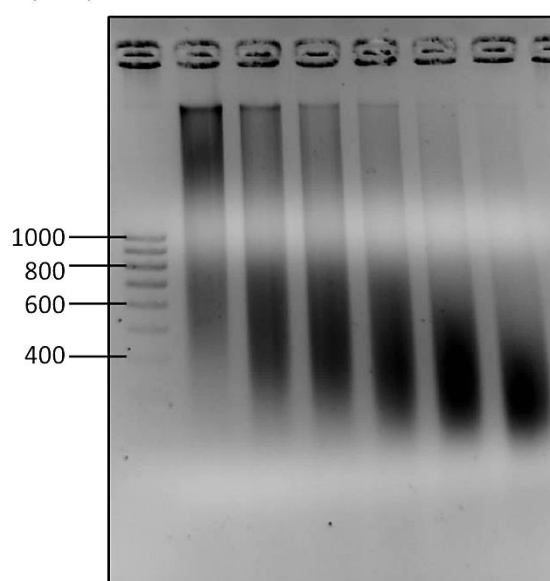


Figura 19. Optimización de la sonicación de la cromatina obtenida de la línea celular RAW 264.7. 1×10^7 de células RAW 264.7 por condición fueron sometidas a doble fijación, con formaldehído 1% y con el compuesto DSG a 2mM, tras lo cual la cromatina fue sonicada durante los tiempos indicados. El ADN purificado de la cromatina fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 2% y posterior exposición a bromuro de etidio para verificar su fragmentación.

Inmunoprecipitación de LXR α en células MEFs

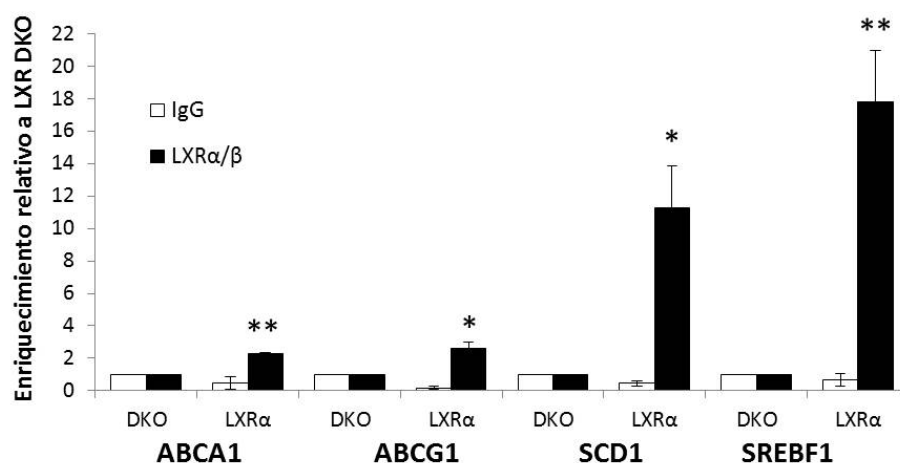


Figura 20. La inmunoprecipitación de los receptores nucleares LXR α / β requiere un paso inicial de doble fijación. Inmunoprecipitación de cromatina realizado en células MEFs LXR WT y LXR DKO. La cromatina se fijó en dos pasos con formaldehído al 1% y con DSG 2mM, antes de su sonicación e inmunoprecipitación con el anticuerpo policlonal dirigido contra LXR α / β . El enriquecimiento de la secuencia específica amplificada por qPCR se muestra relativizado a la amplificación obtenida con el genotipo LXR DKO. Se muestran los valores medios de al menos 2 experimentos de ChIP independientes y en cada barra el error estándar (SEM). La significancia estadística es * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al genotipo LXR DKO.

3.3. Congelación de la cromatina previa a la sonicación.

Una cuestión relevante no sólo para la eficiencia de la técnica, sino para la planificación de la ejecución de la misma (debido a lo prolongado en el tiempo que supone este protocolo), es la posibilidad de establecer un punto de interrupción conveniente durante el cual se pueda preservar la muestra sin alteración alguna. Ensayamos la posibilidad de congelar la cromatina extraída a -80°C , previa a la sonicación y verificamos la calidad del material sonificado posteriormente en gel de agarosa y el rendimiento ante una inmunoprecipitación con anticuerpos de control y específicos. La cromatina purificada e inmediatamente sonicada presentaba un patrón de sonicación similar con independencia del tiempo de sonicación, a diferencia de la cromatina congelada durante 30 minutos y sonicada durante los mismos tiempos que la primera (Fig. 21). Por ello, establecimos como un paso obligado en el protocolo de inmunoprecipitación de cromatina la congelación durante al menos 30 minutos a una temperatura de -80°C antes de iniciar la sonicación.

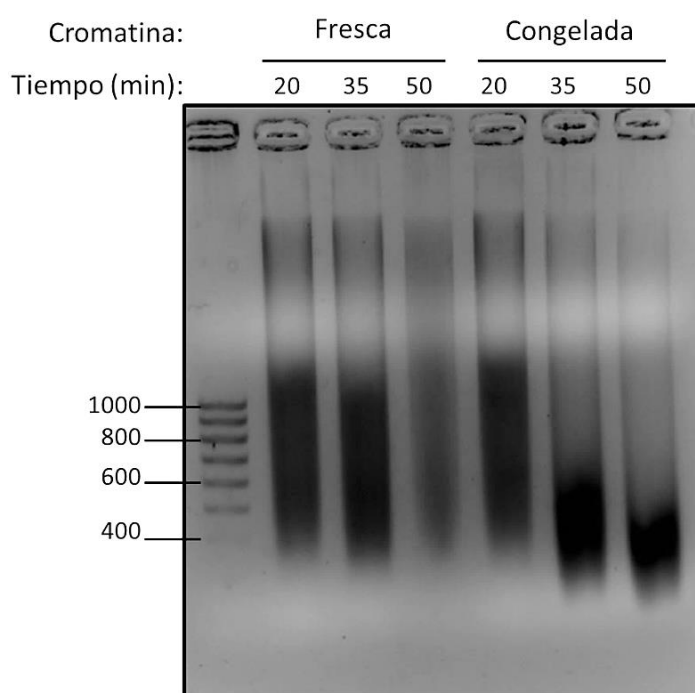


Figura 21. La congelación de la cromatina es importante para una sonicación efectiva. Comparación de ADN purificado a partir de cromatina sonicada directamente tras la extracción y cromatina congelada durante 30 minutos a -80°C previa a su sonicación. La cromatina de cada condición de tiempo ensayada fue obtenida de 1×10^7 de macrófagos peritoneales.

3.4. Inmunoprecipitación de la proteína endógena RXR α en células fibroblásticas embrionarias de ratón (MEFs).

Nuestro siguiente objetivo consistió en alcanzar un control de la técnica de forma que lográramos inmunoprecipitar proteínas endógenas de la célula sin necesidad de inducir su expresión en condiciones suprafisiológicas. Empleamos sobre las células MEFs LXR DKO y MEFs que expresan LXR α dos anticuerpos específicos: uno dirigido contra ambos receptores LXR y otro contra la proteína con la que LXR forma heterodímeros, RXR α . La amplificación posterior por qPCR de los fragmentos derivados de la unión del anticuerpo contra LXR produjo aproximadamente el doble de enriquecimiento que con el anticuerpo de RXR α en todos los genes examinados. Obtuvimos un enriquecimiento *a priori* inesperadamente elevado en el genotipo de control negativo, MEFs LXR DKO, en la zona de unión de LXR cercana al gen *Scd1* (Fig. 22A). La comprobación de una posible unión de la proteína RXR α en la región amplificada con nuestros cebadores para este gen la realizamos con los resultados de secuenciación de ChIP obtenidos por otros autores (Boergesen et al. 2012) en hepatocitos LXR WT o deficientes en la expresión de las proteínas LXR (LXR DKO) (Fig. 22B). Estos resultados indican que efectivamente en esa región existe una unión de la proteína RXR α en el genotipo LXR DKO, probablemente heterodimerizando con otro receptor nuclear distinto a LXR, lo cual respalda nuestros resultados y la eficacia del protocolo puesto a punto por nuestro grupo.

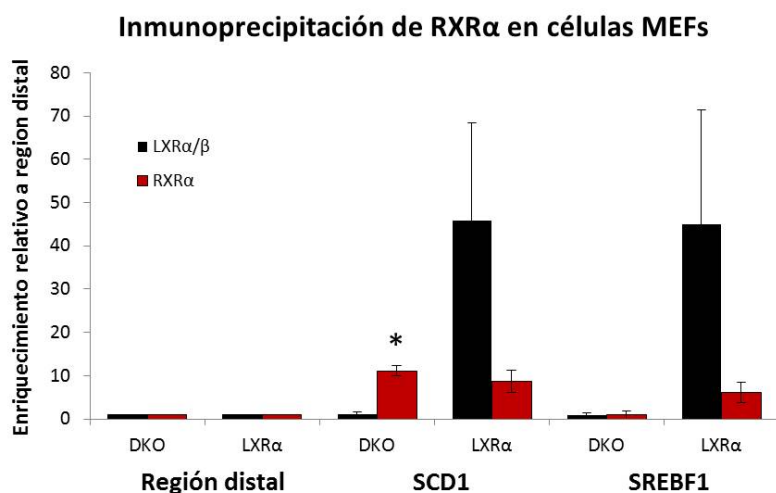
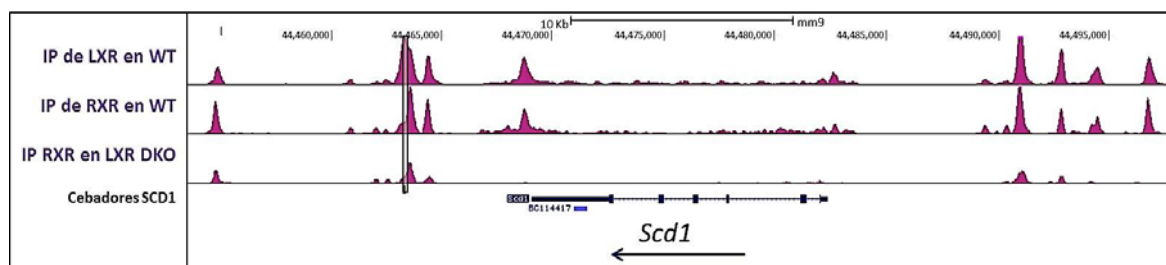
A**B**

Figura 22. Inmunoprecipitación de la proteína endógena RXR α en células MEFs. La cromatina extraída de células MEFs fue doblemente fijada, sonicada y sometida a inmunoprecipitación con los anticuerpos frente a LXR α / β o RXR α . La amplificación por qPCR con los cebadores para la región específica próxima al gen *Scd1* revela la unión de la proteína RXR α unida a esa secuencia de ADN en el genotipo LXR DKO (A) lo cual fue contrastado con los resultados de ChIP-seq obtenidos por los laboratorios de Boergesen, Mandrup y Gustafsson (Boergesen et al., 2012) en hepatocitos LXR/RXR WT y LXR DKO (B). La franja clara en la imagen de Genome Browser resalta la región amplificada por los cebadores de *Scd1*. La flecha indica la dirección de transcripción del gen *Scd1*. La escala de la primera representación de ChIP-seq “IP (inmunoprecipitación) de LXR en WT” es de 400 y las demás es de 200. En (A) se muestran los valores medios de al menos 2 experimentos de ChIP independientes y en cada barra el error estándar (SEM). La significancia estadística es * $p < 0,05$ de la unión del anticuerpo que reconoce RXR α con respecto a la unión en la región distal.

3.5. Aplicación de la técnica de inmunoprecipitación de cromatina a macrófagos primarios murinos.

Con el objetivo de trasladar el protocolo de ChIP a células primarias realizamos pruebas sobre cromatina extraída de macrófagos peritoneales LXR WT. Como ya hicimos al aplicar esta técnica a tipos celulares nuevos, realizamos inicialmente sonicaciones a diferentes tiempos aumentando de 5 en 5 minutos la duración, en este caso entre 35 y 85 minutos. Aumentamos el número de células que se someterían al paso de la sonicación y establecimos $12,5 \times 10^6$ de células como unidad de sonicación. También establecimos $0,6\mu\text{g}$ de ADN como la cantidad óptima para visualización de la fragmentación del material sonicado. Se determinó el mejor tiempo de sonicación en 70 minutos para macrófagos peritoneales (Fig. 23).

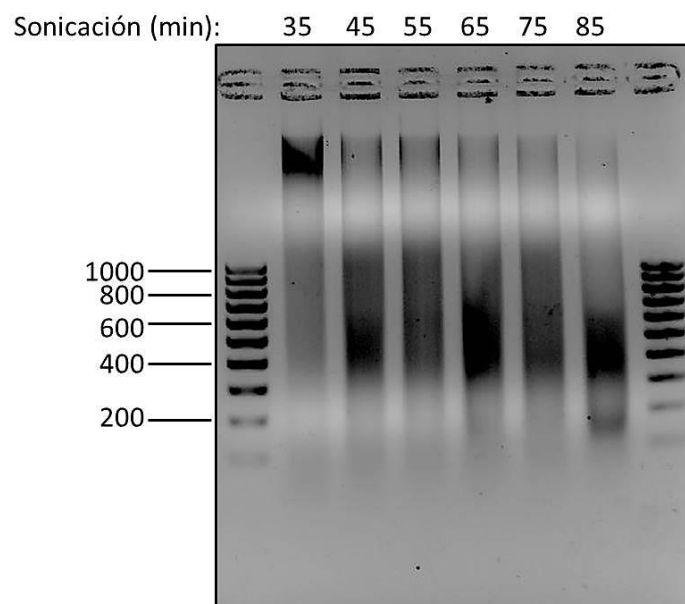


Figura 23. Optimización del tiempo de sonicación de cromatina obtenida de macrófagos peritoneales. La cromatina obtenida de $12,5 \times 10^6$ de células por condición fue doblemente fijada, congelada y sonicada durante los tiempos indicados. Se tomaron $0,6\mu\text{g}$ de ADN para la comprobación de su fragmentación en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio.

Seguidamente realizamos experimentos de ChIP con anticuerpo policlonal que reconoce las proteínas LXR en macrófagos peritoneales, tomando como control negativo macrófagos de ratones LXR DKO (Fig. 24) y después con el anticuerpo monoclonal dirigido únicamente contra LXR α (Abcam) y tomando como control la unión de inmunoglobulina de tipo G obtenida de suero preinmune de ratón (Fig. 25). En ambos casos pudimos comprobar que se producía un enriquecimiento destacado con cada anticuerpo elegido en las zonas reguladoras cercanas a genes diana de LXR.

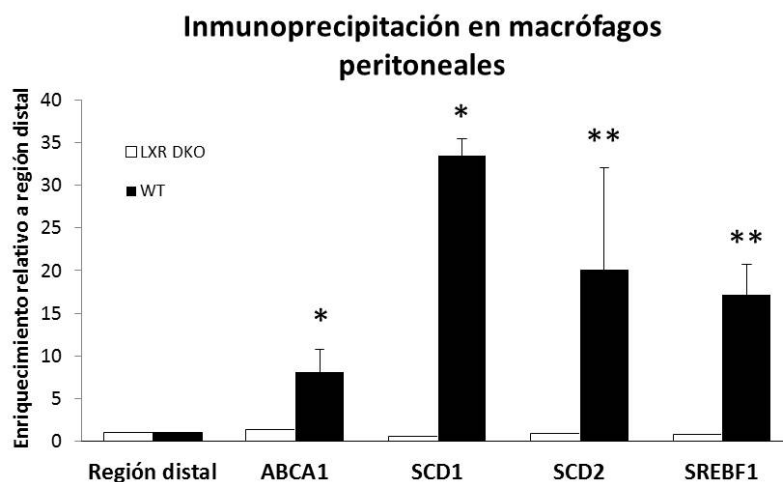


Figura 24. Inmunoprecipitación de cromatina de los receptores nucleares endógenos LXR α / β en macrófagos primarios peritoneales. La inmunoprecipitación de la cromatina obtenida de macrófagos peritoneales LXR WT y LXR DKO, tratados con GW3965 1 μ M durante 24 horas, se realizó con el anticuerpo policlonal contra LXR α / β . El enriquecimiento en cada uno de los genes diana de LXR en cada genotipo fue relativizado a los valores obtenidos de una región carente de unión de la proteína LXR. Se muestran los valores medios de al menos 2 experimentos de ChIP independientes y en cada barra el error estándar (SEM). La significancia estadística es * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto a la región distal.

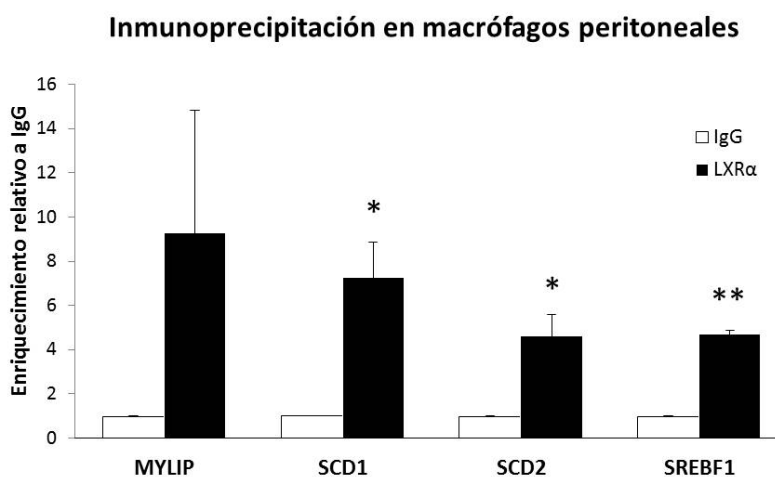


Figura 25. Inmunoprecipitación de cromatina con el anticuerpo específico dirigido contra el receptor nuclear LXR α en macrófagos peritoneales. La cromatina obtenida de macrófagos primarios peritoneales LXR WT tratados con GW3965 1 μ M durante 24 horas fue inmunoprecipitada con un anticuerpo específico monoclonal contra LXR α (Abcam). Como control de unión inespecífica se utilizó una inmunoglobulina de tipo G de suero preinmune de ratón. Se muestran los valores medios de al menos 2 experimentos de ChIP independientes, en cada barra se representa barra el error estándar (SEM). La significancia estadística es * $p < 0,05$ en la unión del anticuerpo monoclonal con referencia a la unión del anticuerpo de control.

Con el objetivo de verificar la sensibilidad y eficiencia de los anticuerpos empleados en los experimentos, así como la fiabilidad del control elegido carente del receptor LXR α , se realizaron experimentos de ChIP sobre macrófagos peritoneales de dos genotipos: LXR WT y LXR α KO con los dos tipos de anticuerpos: monoclonal, dirigido contra LXR α y policlonal, dirigido contra ambos receptores LXR (Fig. 26). Como esperábamos, en el genotipo LXR WT el anticuerpo monoclonal exhibe un enriquecimiento en los sitios de unión de LXR, en zonas reguladoras de genes diana conocidos, de menor magnitud del que mostraba el anticuerpo policlonal. A su vez este anticuerpo era el único capaz de inmunoprecipitar la proteína LXR β en el genotipo LXR α KO, no obteniéndose amplificación para ningún gen diana de LXR en este genotipo con el anticuerpo monoclonal. Estos resultados confirman que el uso de los anticuerpos monoclonal y policlonal de LXR es válido para garantizar el reconocimiento específico, tanto de la proteína LXR α como de ambas proteínas LXR, respectivamente. También se confirma la idoneidad del genotipo LXR α KO como control del reconocimiento de la unión del receptor LXR β con el anticuerpo policlonal dual que reconoce ambos receptores LXR (Fig. 26).

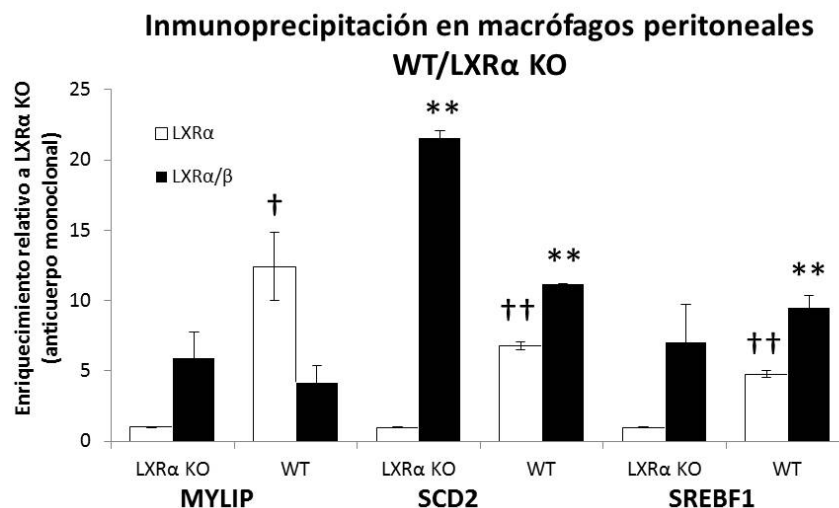


Figura 26. Inmunoprecipitación de los receptores nucleares LXR α / β endógenos en macrófagos primarios peritoneales LXR WT y LXR α KO. La cromatina obtenida de macrófagos peritoneales LXR WT y LXR α KO tratados con GW3965 1 μ M durante 24 horas fue sometida a inmunoprecipitación con dos tipos de anticuerpos contra LXR: uno monoclonal contra LXR α (Abcam) y otro policlonal contra ambas proteínas LXR. Los resultados de la amplificación por qPCR fueron relativizados a los valores de amplificación obtenidos en el genotipo LXR α KO en presencia del anticuerpo monoclonal. Se muestran los valores medios de al menos 2 experimentos de ChIP independientes y en cada barra el error estándar (SEM). La significancia estadística es * p <0,05 y ** p <0,01 en la unión del anticuerpo policlonal con respecto al enriquecimiento del anticuerpo monoclonal en el genotipo LXR α KO. La significancia estadística de la unión del anticuerpo monoclonal con referencia a este anticuerpo en el genotipo LXR α KO se representa por † p <0,05 y †† p <0,01.

3.6. Aplicación de la técnica de inmunoprecipitación de cromatina a las líneas immortalizadas de macrófago generadas: 3FLAG-LXR α y 3FLAG-LXR β . Rendimiento del anticuerpo específico anti-FLAG.

Una vez obtenidas las líneas celulares immortalizadas que expresan cada uno de los receptores LXR alternativamente unidos al péptido FLAG realizamos experimentos de ChIP con un anticuerpo monoclonal específico dirigido contra este péptido. La utilización de este anticuerpo supone una ventaja al estar generado contra un péptido artificial inexistente de forma natural en la célula, por lo que se consigue reducir al máximo las uniones inespecíficas y permitiría obtener enriquecimientos de magnitud mayor que en las células primarias. También se evitan posibles sesgos en los resultados, debido a que la afinidad en la cromatina proveniente de las líneas celulares es la misma, a pesar de que se trata de la inmunoprecipitación de dos receptores distintos. Se probó la técnica de ChIP en ambas líneas tratadas con el agonista de LXR, GW3965, y como control se eligió la inmunoglobulina sérica de ratón de tipo G. El enriquecimiento en la inmunoprecipitación de LXR α y LXR β , registrado en la vecindad de los genes diana conocidos en ambas líneas resultó ser similar entre ellas (Figs. 27A y B).

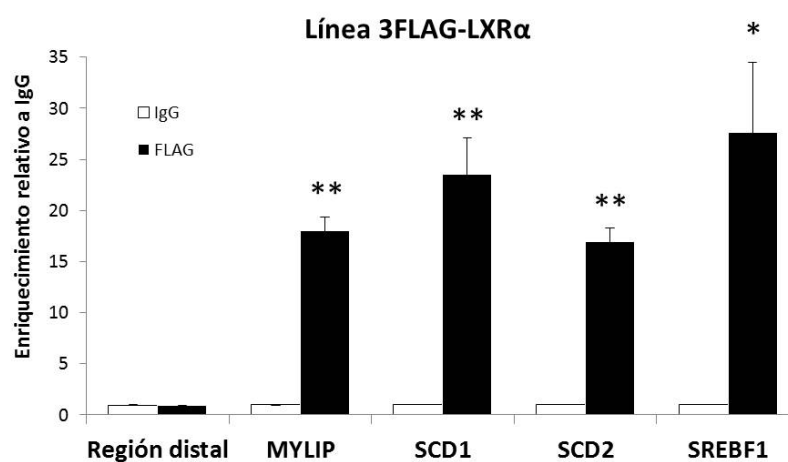
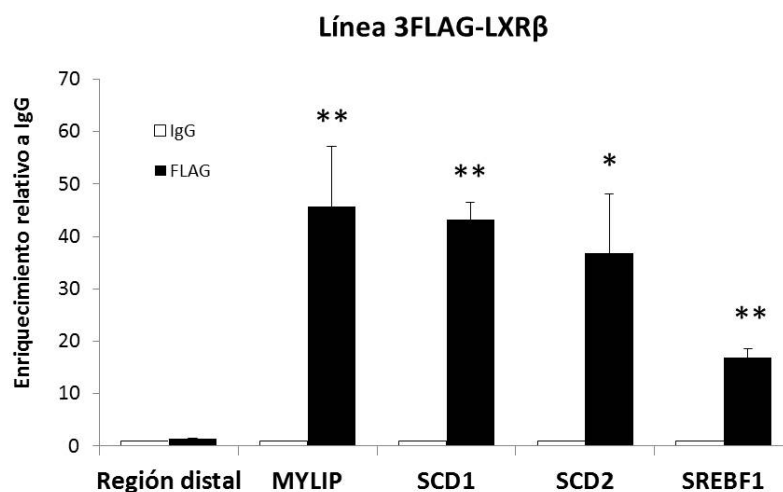
A**B**

Figura 27. Inmunoprecipitación de los receptores LXR α y LXR β en las líneas de macrófago 3FLAG-LXR α y 3FLAG-LXR β . Los receptores LXR expresados en las líneas celulares inmortalizadas, tratadas previamente con el ligando sintético de LXR durante 24 horas, se inmunoprecipitaron con el anticuerpo dirigido contra el polipéptido FLAG en la línea 3FLAG-LXR α (A) y 3FLAG-LXR β (B). Se muestran los valores medios de al menos 4 experimentos de ChIP independientes y en cada barra el error estándar (SEM). La significancia estadística es * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto a la inmunoglobulina de control.

3.7. Comprobación de la unión de LXR a los genes diana en condiciones de tratamiento con el agonista y antagonista sintéticos de LXR: GW3965 y GW233.

Los receptores LXR se encuentran unidos en el genoma a los sitios de regulación de los genes que controlan hasta que unen el ligando y se activa su actividad transcripcional. Decidimos analizar si la capacidad de unión intrínseca de los receptores se ve alterada o no por el tratamiento con el antagonista sintético de LXR, GW233 de en ambas líneas inmortalizadas. Como control se ensayó la unión de los receptores bajo el tratamiento con el agonista GW3965 y se relativizó a la unión en una región distal, como control de una región donde no se espera encontrar unión de las proteínas LXR. El ADN purificado de la inmunoprecipitación con el anticuerpo específico que reconoce el péptido FLAG fue amplificado con los cebadores diseñados en los sitios genómicos de unión de LXR en los genes diana *Mylip*, *Scd1*, *Scd2* y *Srebf1* (Fig. 28A y B). El enriquecimiento registrado con los dos tratamientos resultó ser robusto y muy similar entre ambas líneas celulares. Estos resultados validan nuestra aproximación en el estudio de la activación y localización del receptor LXR en las secuencias de unión próximas a los genes que controla transcripcionalmente. Se comprueba con estos experimentos que independientemente del bloqueo de la actividad transcripcional de LXR con el antagonista sintético GW233, la unión del receptor nuclear a los mismos sitios que se uniría para activar la transcripción de los genes diana examinados se sigue produciendo.

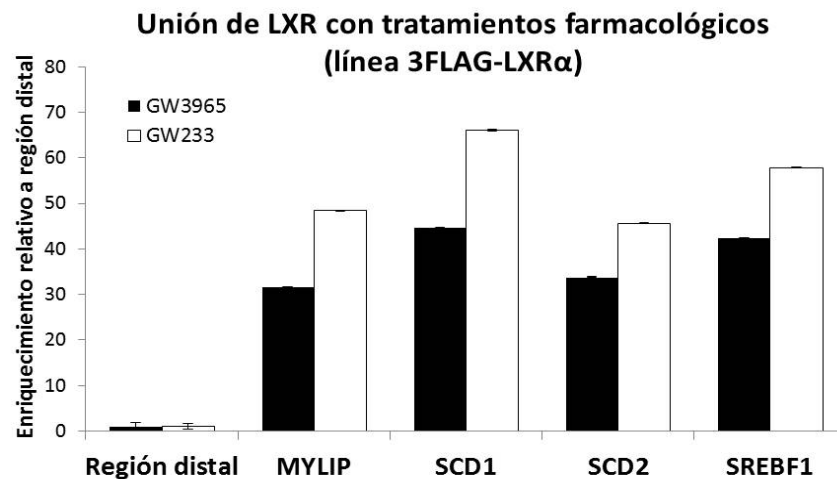
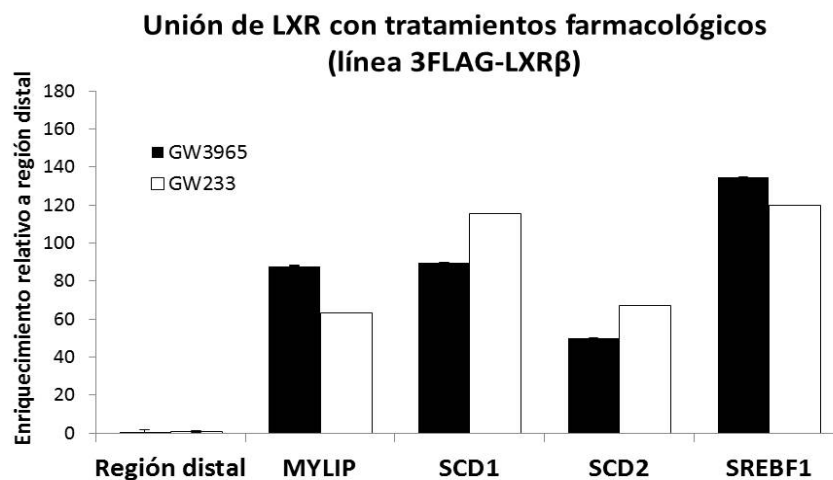
A**B**

Figura 28. El tratamiento farmacológico con el antagonista de LXR, GW233, no altera la capacidad de unión del receptor LXR a la secuencia consenso que reconoce. Las líneas generadas de expresión 3FLAG-LXR α (A) y 3FLAG-LXR β (B) fueron tratadas con el agonista de LXR GW3965 o el antagonista GW233, ambos 1 μ M, durante 24 horas antes de realizar la inmunoprecipitación con el anticuerpo dirigido contra la cola polipeptídica FLAG de los receptores LXR. La amplificación por qPCR de los fragmentos inmunoprecipitados con cebadores específicos que flanquean las secuencias consenso de unión de la proteína LXR se muestra relativizada a la amplificación en una región no relevante para la unión de LXR. Se muestra un experimento representativo de inmunoprecipitación y en cada barra la desviación estándar de los triplicados realizados en la amplificación por qPCR.

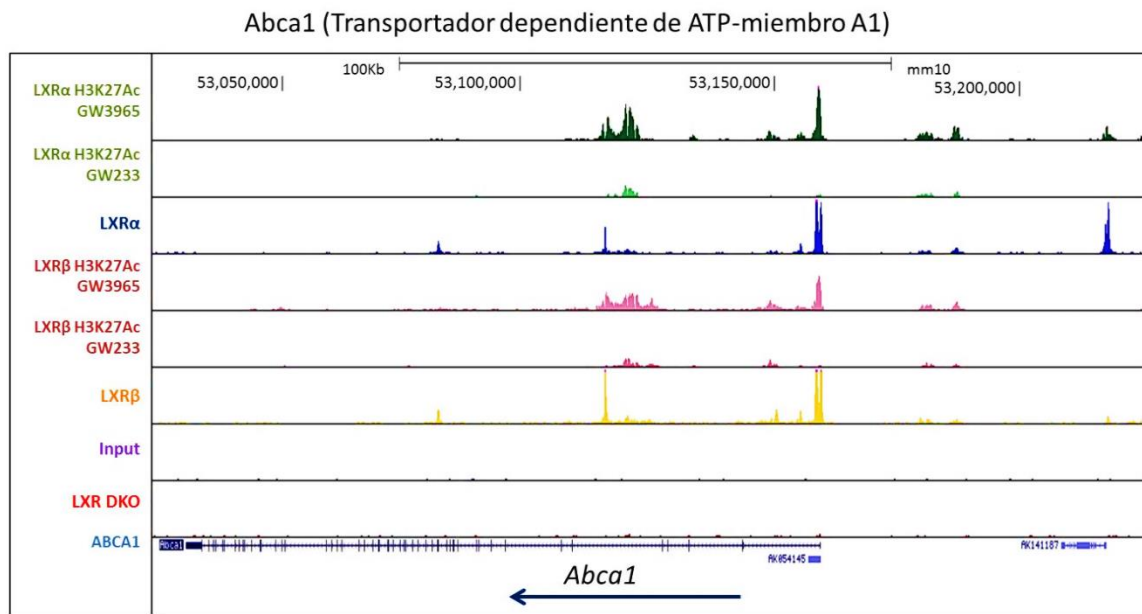
4. Estudio del patrón de unión en el genoma (cistroma) de cada receptor nuclear LXR en las líneas inmortalizadas de macrófago 3FLAG-LXR α y 3FLAG-LXR β mediante ChIP.

El siguiente paso fue trasladar la técnica de ChIP a nivel del genoma entero con la secuenciación completa de los fragmentos inmunoprecipitados. Se realizaron al menos 3 experimentos de ChIP independientes con el anticuerpo específico FLAG en las líneas LXR DKO, 3FLAG-LXR α y 3FLAG-LXR β , en los cuales se sonicaron e inmunoprecipitaron al menos 2 tubos por condición a un mismo tiempo y se combinó el material genético purificado. La decisión de combinar experimentos biológicos distintos (réplicas) obedeció a que la cantidad de ADN de doble cadena necesario para la secuenciación masiva requería de un mínimo necesario que era difícil de conseguir en experimentos individuales.

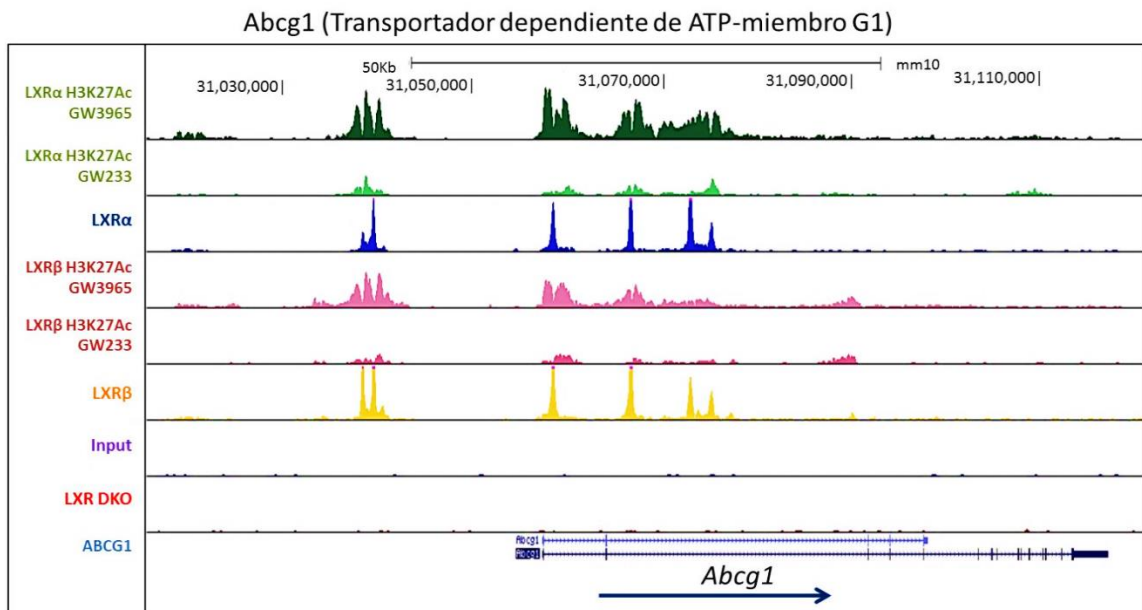
Una vez secuenciado el ADN y alineados los fragmentos con la versión del genoma de ratón más reciente (mm10) con herramientas bioinformáticas se procedió a la comprobación de la calidad y resolución del resultado de la técnica de ChIP. Elegimos varios genes diana de LXR para su visualización con la interfaz gráfica de Genome Browser, donde se habían sido almacenados los datos relativos a nuestros experimentos de ChIP-seq (Fig. 29A-F). Comprobamos que todos los genes diana disponían de una buena resolución de los sitios de unión de LXR, representados con forma de vértices o picos bidimensionales, bien delimitados y con una altura distinguible con respecto a regiones genómicas no relacionadas con la unión de los receptores LXR (Fig. 29G) y con respecto al genoma de la línea LXR DKO, cuya representación en paralelo sirvió de control de la inmunoprecipitación de fragmentos inespecíficamente. El análisis global de los datos bioinformáticos de ChIP-seq corresponde a un trabajo en progreso que ha quedado encuadrado fuera de esta memoria de Tesis Doctoral.

Resultados

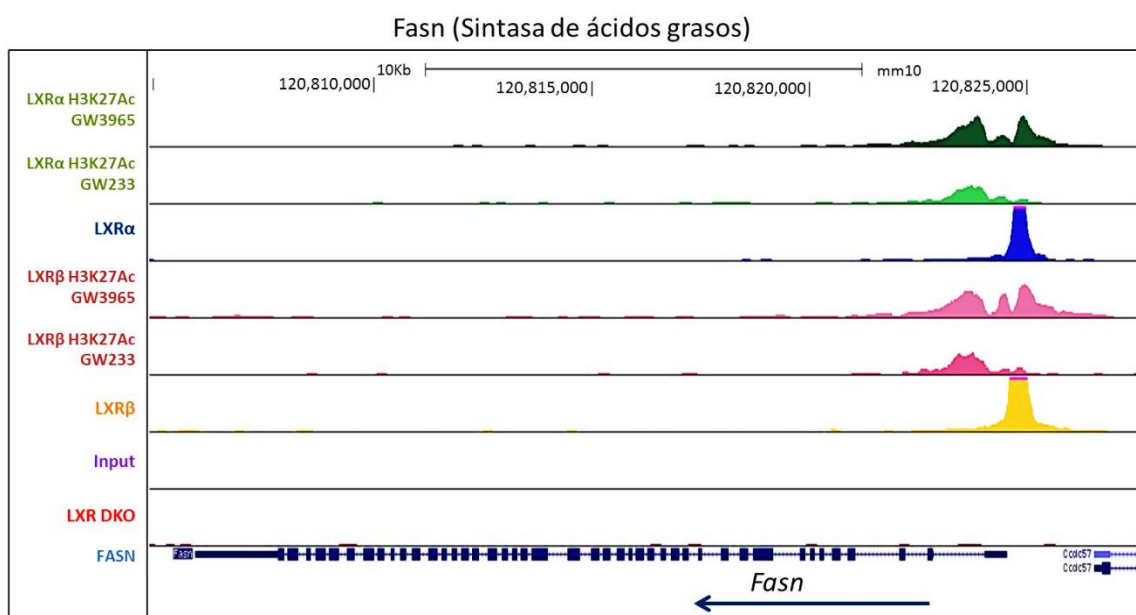
A



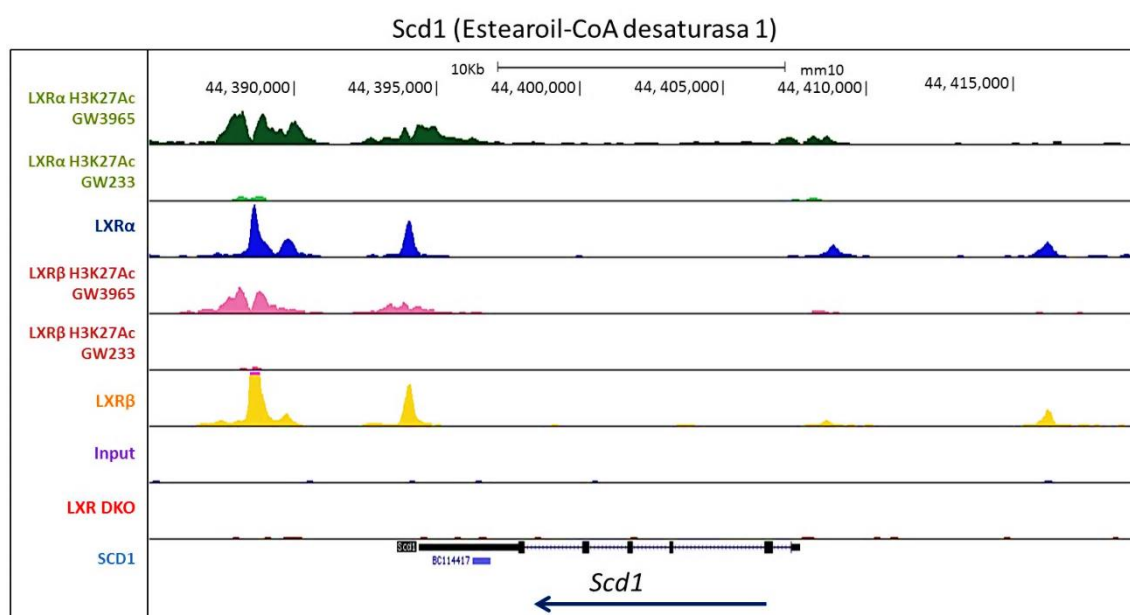
B



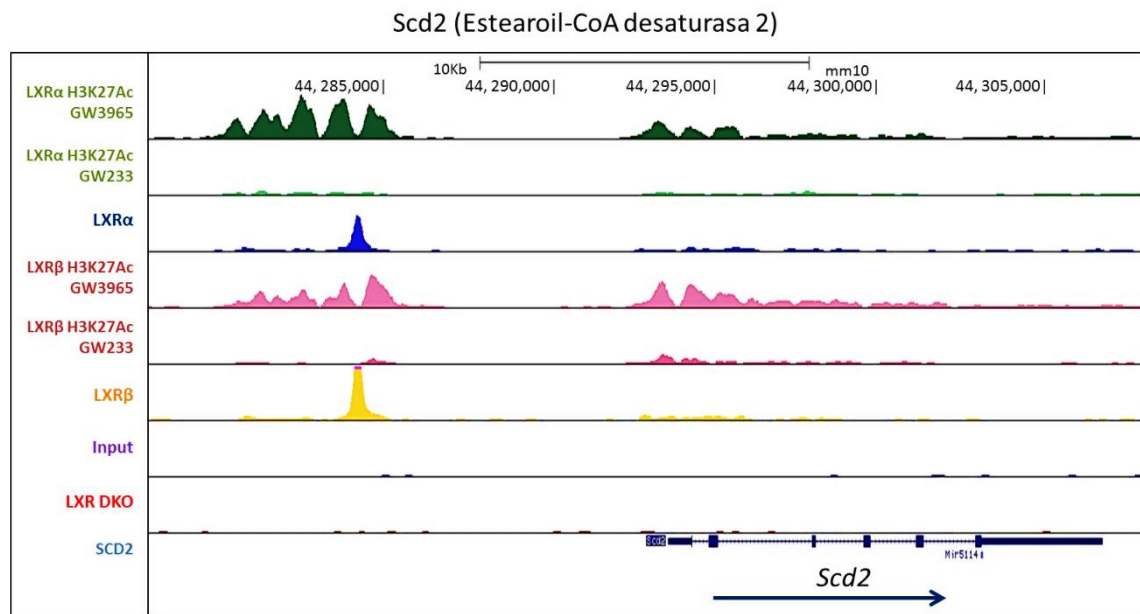
C



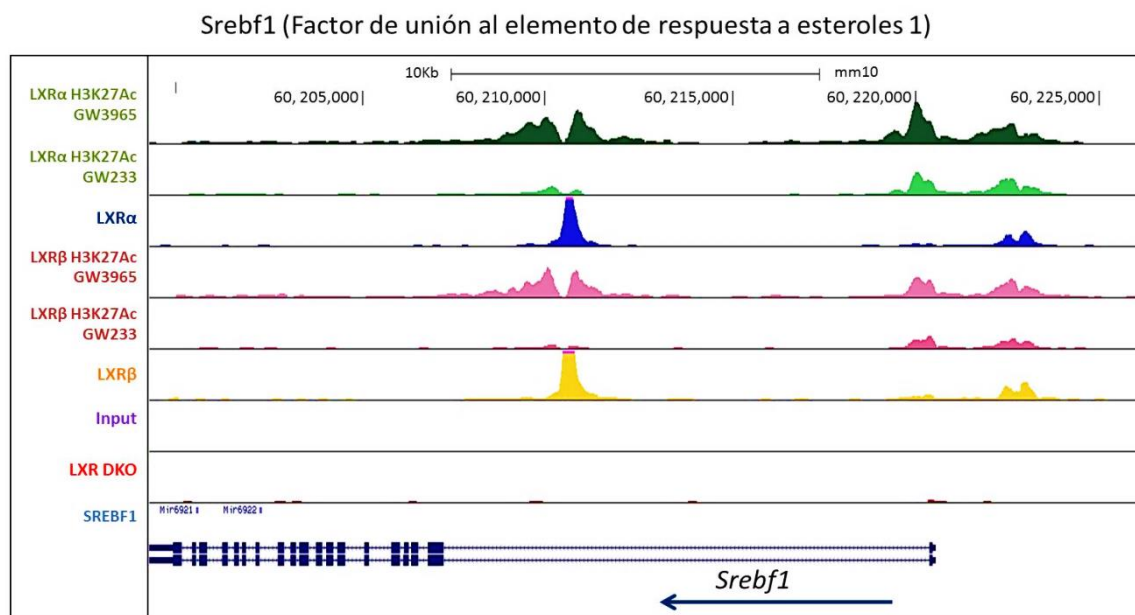
D

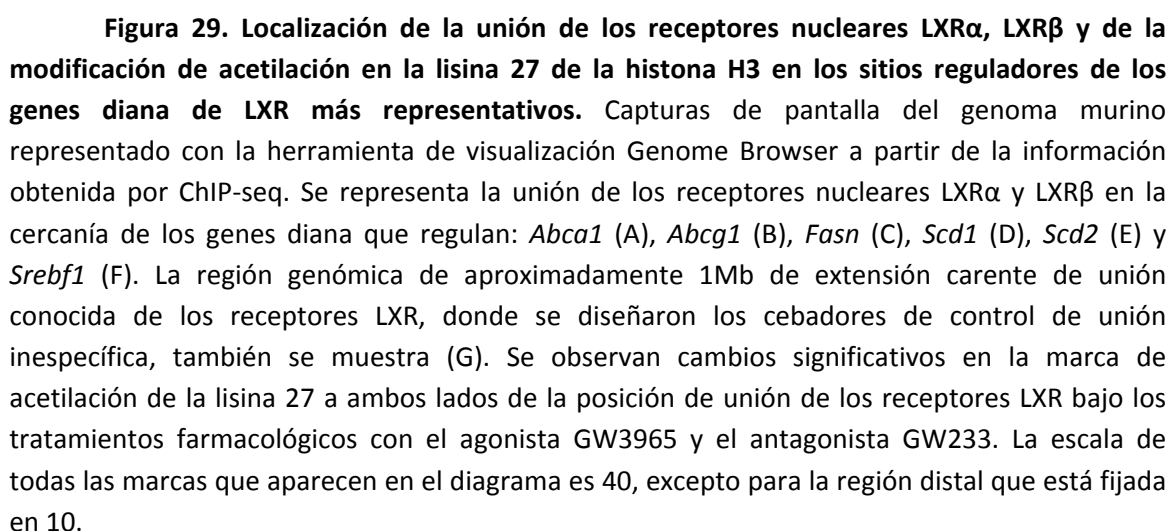


E



F





5. Análisis de la acetilación en la lisina 27 de la histona H3, una marca genética asociada con la expresión génica en respuesta a la modulación de la actividad de LXR.

La identificación de la unión de factores de transcripción en las proximidades del sitio de inicio de transcripción de un gen no implica necesariamente que la transcripción esté siendo activa en ese momento. Sin embargo, existen modificaciones que se producen en las colas polipeptídicas de las histonas que modulan el estado de compactación de la cromatina y por ello están relacionadas con la accesibilidad del ADN a factores implicados en la transcripción. La información proporcionada por estas marcas es de gran utilidad para identificar genes predispuestos para la transcripción en respuesta a estímulos determinados.

Por ello nos propusimos analizar la aparición de la marca de acetilación en la lisina 27 de la histona H3, tras el tratamiento con el agonista y antagonista sintéticos, GW3965 y GW233. La detección de cambios en esta marca a nivel cualitativo y cuantitativo complementará la información obtenida del estudio de cistroma de LXR. La identificación de patrones de localización de esta modificación y sus cambios en respuesta a los tratamientos en los genes diana conocidos servirá de modelo para la búsqueda de nuevos genes diana regulados por LXR.

Se llevó a cabo la inmunoprecipitación de la histona H3 acetilada en la lisina 27, en las líneas 3FLAG-LXR α y 3FLAG-LXR β de forma paralela (Fig. 30). Fue posible la detección de un enriquecimiento elevado de esta modificación tras el tratamiento con el agonista GW3965 en las zonas reguladoras cercanas a los genes examinados: *Abca1*, *Myliip*, *Scd1* y *Srebf1*. Sin embargo, tras el tratamiento con el antagonista GW233, no es posible detectar apenas esta modificación. Asimismo, su enriquecimiento en una región no relevante para la unión de los receptores LXR se asemeja al enriquecimiento en la unión detectado en presencia del antagonista. Con este experimento de inmunoprecipitación se revela que los cambios en el enriquecimiento de esta marca ante los tratamientos farmacológicos alcanzan una magnitud muy similar en ambas líneas celulares, en las regiones reguladoras de los genes examinados (Fig. 30).

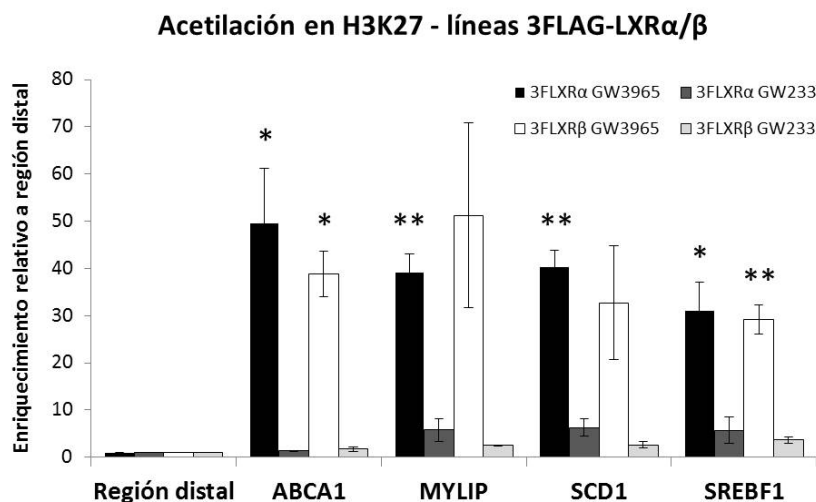


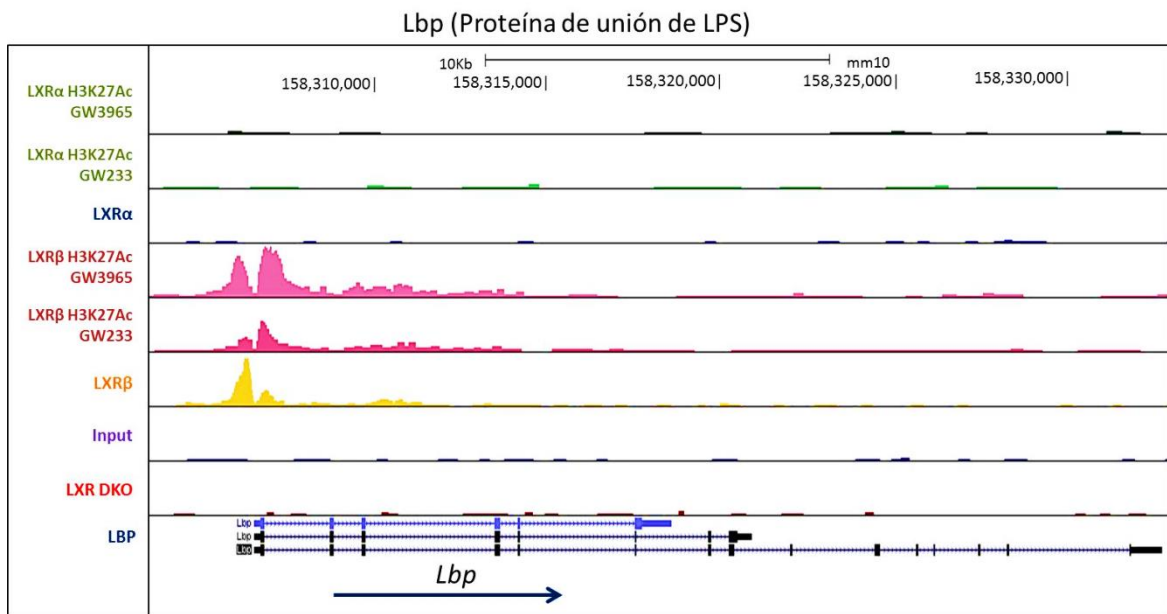
Figura 30. La acetilación en la lisina 27 de la histona H3 experimenta cambios de magnitud muy similares en los genes diana de LXR en ambas líneas 3FLAG-LXR α y 3FLAG-LXR β . Los cambios en la marca de acetilación en la lisina 27 de la histona H3, en las regiones genómicas adyacentes al sitio de unión de LXR en los genes diana conocidos *Abca1*, *Myliip*, *Scd1* y *Srebf1* fue detectada con ChIP bajo dos condiciones de tratamiento: tratamiento con el agonista GW3965 y con el antagonista GW233. Se muestran los valores medios de al menos 3 experimentos de ChIP independientes y en cada barra el error estándar (SEM). La significancia estadística es * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto a la región distal no activa transcripcionalmente.

Como ya pudo observarse en la figura 29, los resultados obtenidos de los experimentos de ChIP-seq en cuanto a la localización de la marca de acetilación en la histona H3 se han mostrado junto a la posición en el genoma de la unión de los receptores LXR en cada línea. De forma característica esta marca se dispone a modo de crestas, más o menos extensas en longitud y flanqueando los sitios de unión de factores de transcripción, donde la altura que alcanza la marca es menor, se dispondrían los sitios de unión de los receptores LXR.

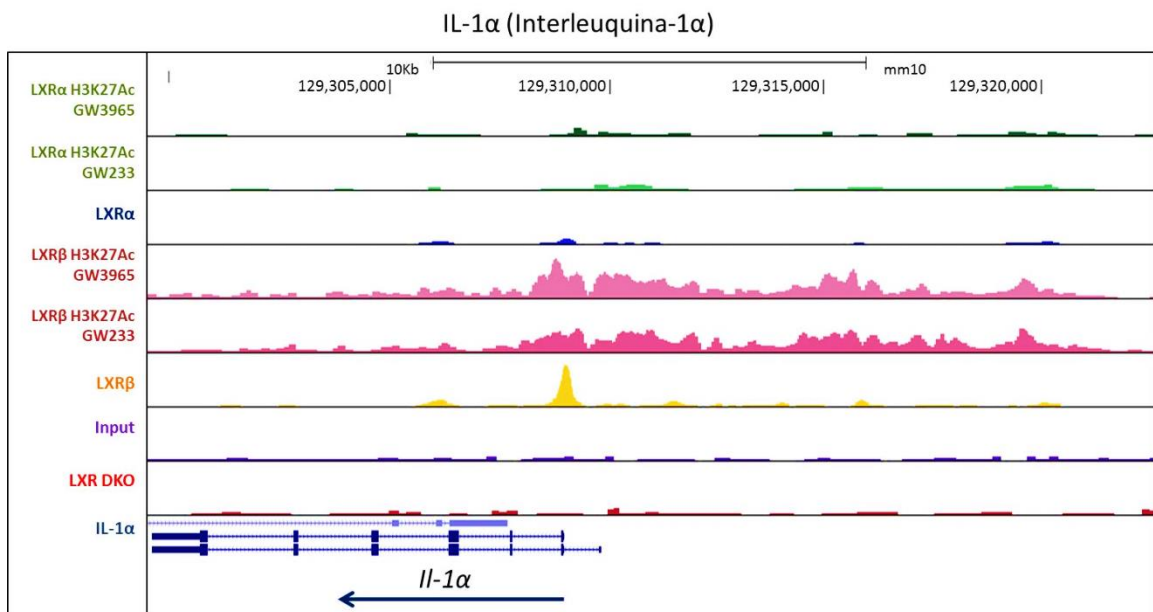
Una vez obtenida esta información referente al posicionamiento de los receptores LXR en el genoma y la extensión de las marcas de acetilación en la histona H3, consultamos el estado de la cromatina en la cercanía de los genes novedosos que se desprenden del análisis de microarrays: *Il-1 α* , *Lbp* y *Orm-3*. Se identificó en todos ellos una unión superior del receptor LXR β unido a FLAG, que resultaba destacable frente a 3FLAG-LXR α , así como cambios en la modificación de acetilación en la histona H3 únicamente en la línea celular que expresa el receptor 3FLAG-LXR β (Fig. 31A-C). Adicionalmente, no sólo se presentaba este patrón de unión y cambios en el gen *Orm-3*, sino que se trataba de una característica extendida a todos los componentes de la familia orosomucoide (Fig. 31C). Estos datos indican que, muy posiblemente, la expresión de estos tres genes podría estar regulada directamente por la unión de LXR β a las regiones reguladoras de la expresión de estos genes.

Resultados

A



B



C

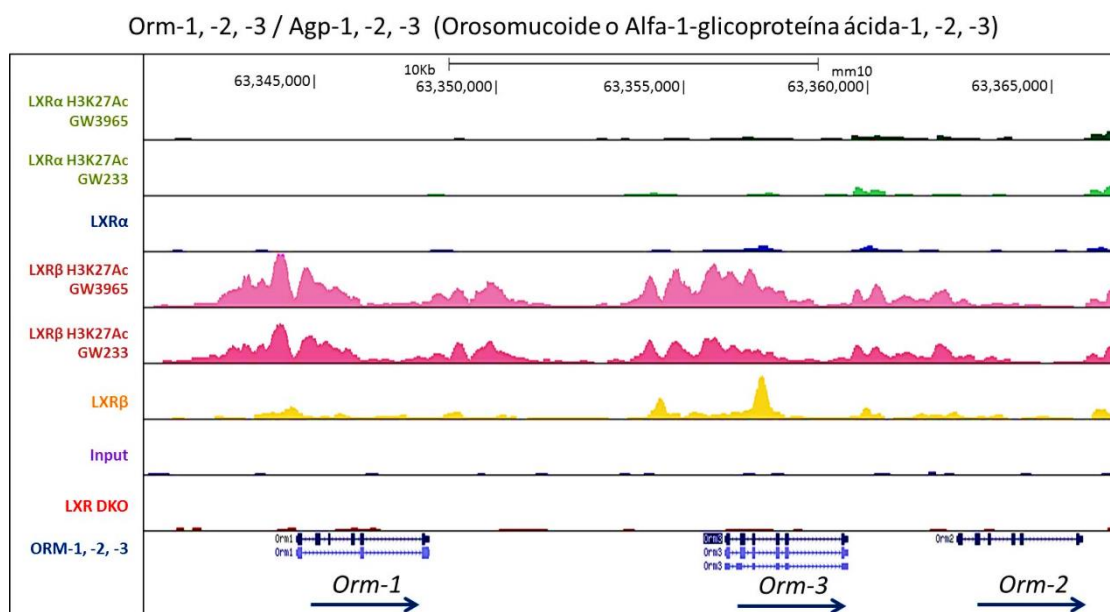


Figura 31. Los genes *Lbp*, *Il-1α* y *Orm-3*, sólo poseen unión del receptor LXRβ y marcas de acetilación asociadas a la línea 3FLAG-LXRβ. Capturas de pantalla de la representación del genoma murino con la herramienta de visualización Genome Browser, en las que se muestran los tres genes que se identificaron inicialmente por experimentos de microarrays regulados exclusivamente por LXRβ: *Lbp* (proteína de unión de lipopolisacárido) (A), *Il-1α* (interleuquina-1α) (B) y *Orm-3* (C), que se muestra junto con los otros 2 miembros de la misma familia orosomucoide o alfa-1-glicoproteínas ácidas. La escala de todas las marcas de cada son iguales, se muestra con una flecha la dirección de transcripción del gen que está representado en cada caso.

6. Verificación de la expresión de los genes *Orm-3*, *Il-1α* y *Lbp* en macrófagos primarios.

A continuación, verificamos la expresión de los genes relevantes del análisis de microarrays, *Orm-3*, *Il-1α* y *Lbp*, en macrófagos primarios murinos LXR WT mediante qPCR. En células diferenciadas de médula ósea con las citoquinas M-CSF (CSF1) y GM-CSF se examinó la expresión de *Il-1α* y *Orm-3*, así como el gen diana clásico de LXR, *Abca1* (Fig. 32A). La expresión del gen *Il-1α* resultó ser varios órdenes de magnitud superior en las células diferenciadas con la citoquina GM-CSF en comparación con aquellas diferenciadas con M-CSF. Sin embargo, la regulación de su transcripción en presencia de los tratamientos con el agonista de LXR o la combinación del agonista de LXR con el agonista de RXR resultó ser más acusada en el segundo caso. La expresión del gen *Orm-3* fue prácticamente indetectable en ambos tipos celulares (datos no mostrados).

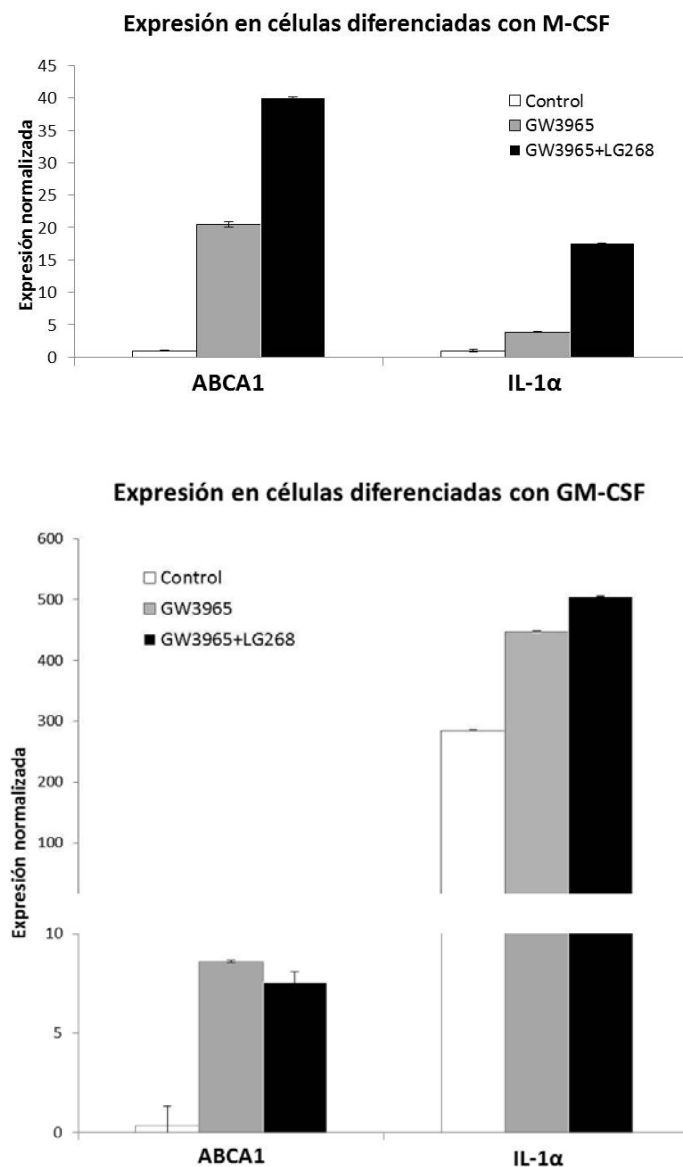
Los macrófagos primarios peritoneales murinos mostraron una regulación de la expresión del gen *Il-1α* en presencia de los tratamientos con los agonistas de LXR y RXR moderada bajo dos tipos de condiciones de serodepresión distintas (0,5% de suero bovino fetal y 0,2% de BSA libre

Resultados

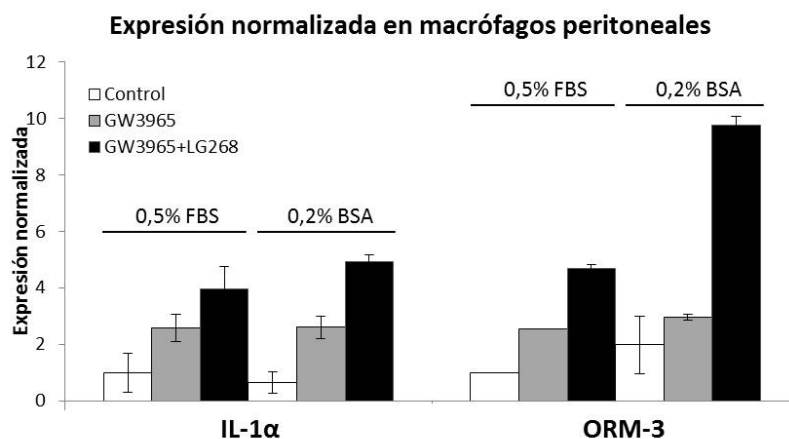
de ácidos grasos con ácido zaragóxico 2 μ M). Sin embargo, la expresión de *Orm-3*, a diferencia de lo que ocurría con las células diferenciadas de médula ósea, resultó ser detectable y su inducción más sensible a la exposición a las condiciones de serodepresión con BSA (Fig. 32B).

Se examinó también la expresión e inducibilidad de los genes *Il-1 α* y *Lbp* en las líneas de macrófago inmortalizado generadas: LXR DKO, 3FLAG-LXR α y 3FLAG-LXR β (Fig. 32C) en presencia del agonista y antagonista sintéticos de LXR. Pudo comprobarse que efectivamente la expresión de estos genes aumenta en respuesta al tratamiento con el agonista de LXR y disminuye en presencia del antagonista, pero sólo de forma destacada en la línea 3FLAG-LXR β , aunque también se detectaron cambios más moderados en el gen *Il-1 α* en la línea 3FLAG-LXR α (Fig. 32C).

A Expresión en células primarias diferenciadas de médula ósea (BMDMs)



B Expresión en macrófagos peritoneales murinos



C Expresión en líneas celulares inmortalizadas

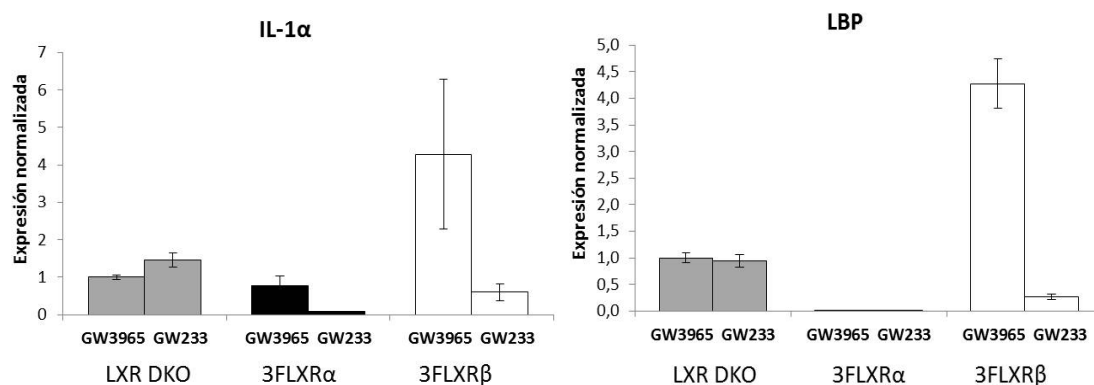


Figura 32. Expresión de *Il-1 α* , *Lbp* y *Orm-3* en macrófagos primarios y clones inmortalizados. La regulación de la expresión de los genes *Il-1 α* y *Abca1* fue examinada por qPCR en macrófagos LXR WT diferenciados de médula ósea con las citoquinas M-CSF, GM-CSF (A) tras el tratamiento con el agonista de LXR o en combinación con el agonista de RXR. En (B) se muestra la expresión de *Il-1 α* y *Orm-3* en macrófagos peritoneales LXR WT y en (C) se representa el cambio en la expresión de *Il-1 α* y *Lbp* en presencia del agonista y el antagonista de LXR en las líneas celulares inmortalizadas. Se muestra un experimento representativo de cada uno y en cada barra la desviación estándar de los triplicados realizados en la amplificación por qPCR.

En vista de los resultados de expresión obtenidos, decidimos caracterizar con mayor detalle la expresión de cada uno de los receptores LXR en macrófagos primarios murinos, tanto de origen peritoneal como diferenciadas de médula ósea con las citoquinas M-CSF y GM-CSF. Se ha considerado de forma generalizada que los niveles de expresión de ambas proteínas LXR son comparables en macrófagos (Joseph et al., 2004), pero no hay estudios que hayan abordado la caracterización de la expresión en diferentes tipos de macrófagos primarios de cada uno de los receptores LXR. El estudio de los niveles de LXR en cada tipo de macrófago que hemos empleado podría ofrecernos una posible explicación a las diferencias observadas en la regulación de los genes *Il-1 α* y *Orm-3* en macrófagos primarios.

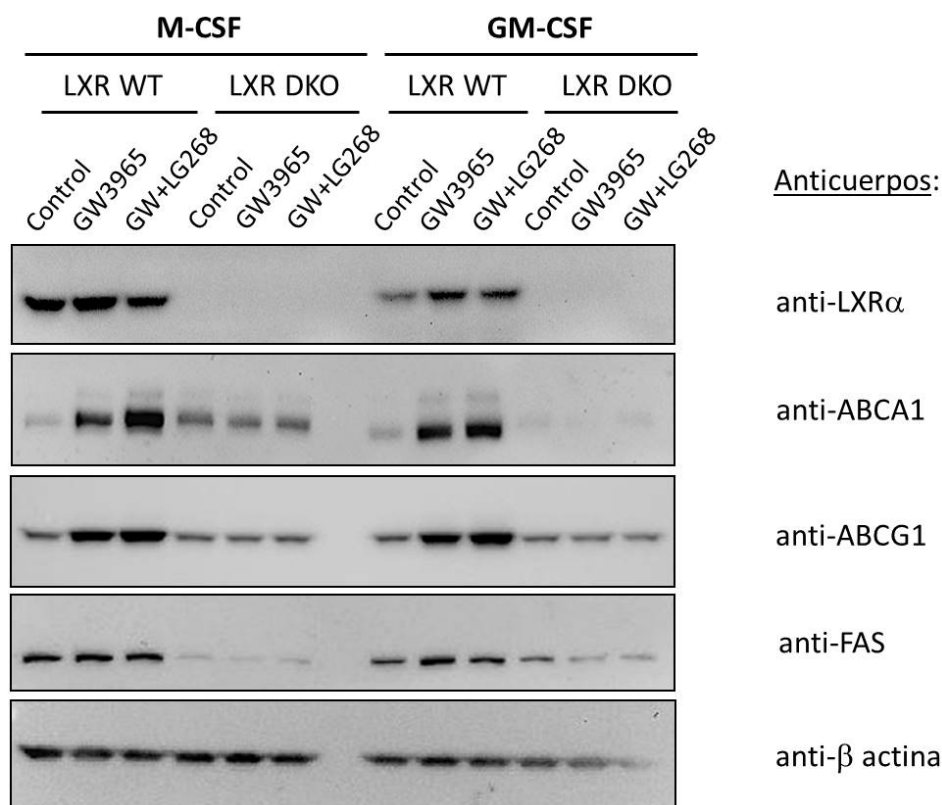
Detectamos por western blot la expresión de LXR α y de ambos receptores LXR con un anticuerpo policlonal, previamente descritos en la presente Tesis Doctoral. Como puede observarse en la figura 33A, la expresión de LXR α es ligeramente más elevada en células de médula ósea diferenciadas con la citoquina M-CSF, pero no se aprecia ninguna diferencia destacable adicional en la regulación de la expresión los genes diana examinados bajo el tratamiento con los agonistas sintéticos. Sólo resulta llamativo el contraste en la expresión de las proteínas ABCA1 y FAS, detectadas en las células carentes de receptores LXR, con la exposición a cada una de las citoquinas empleadas en la diferenciación a macrófago (Fig. 33A).

La detección con el anticuerpo policlonal que reconoce ambos receptores LXR se realizó comparativamente al mismo tiempo en macrófagos primarios peritoneales y diferenciados de médula ósea con las citoquinas M-CSF y GM-CSF (Fig. 33B). En este caso, se observa que el macrófago peritoneal presenta una cantidad muy superior de LXR α comparado con la expresión de las células derivadas de médula ósea. Incluso, la detección de LXR α llevada a cabo con el anticuerpo monoclonal específico, reveló que también existen diferencias apreciables en la expresión de LXR α entre los dos tipos celulares originados de la médula ósea (Fig. 33A). Las células diferenciadas con la citoquina M-CSF presentan una cantidad de proteína LXR α sensiblemente mayor que las células diferenciadas con la citoquina GM-CSF.

Sin embargo, la expresión de LXR β es comparable entre todos estos tipos de macrófago. Asimismo, el aumento en la expresión de los genes diana de LXR se produce con una dinámica similar en todos los tipos de macrófago ante los tratamientos con el agonista de LXR y en combinación con el antagonista de RXR.

Verificamos por qPCR la expresión de los receptores LXR α y LXR β en macrófagos peritoneales y células diferenciadas de médula ósea con las citoquinas M-CSF y GM-CSF, en presencia del agonista de LXR (Fig. 34). En cuanto a los niveles de expresión del receptor LXR α , los macrófagos peritoneales presentan claramente unos niveles muy superiores al resto de macrófagos analizados, pero las células diferenciadas con la citoquina M-CSF exhiben aproximadamente el doble de expresión que las células diferenciadas con GM-CSF. Este resultado coincide con lo observado previamente por western blot, tanto con la incubación con el anticuerpo monoclonal (ver fig. 33A) como con el anticuerpo policlonal (ver fig. 33B). La expresión del receptor nuclear LXR β , por el contrario, es similar en todos los tipos de macrófagos, con pequeñas variaciones entre ellos.

A Células primarias diferenciadas de médula ósea (BMDMs)



B Macrófagos peritoneales y células diferenciadas de médula ósea

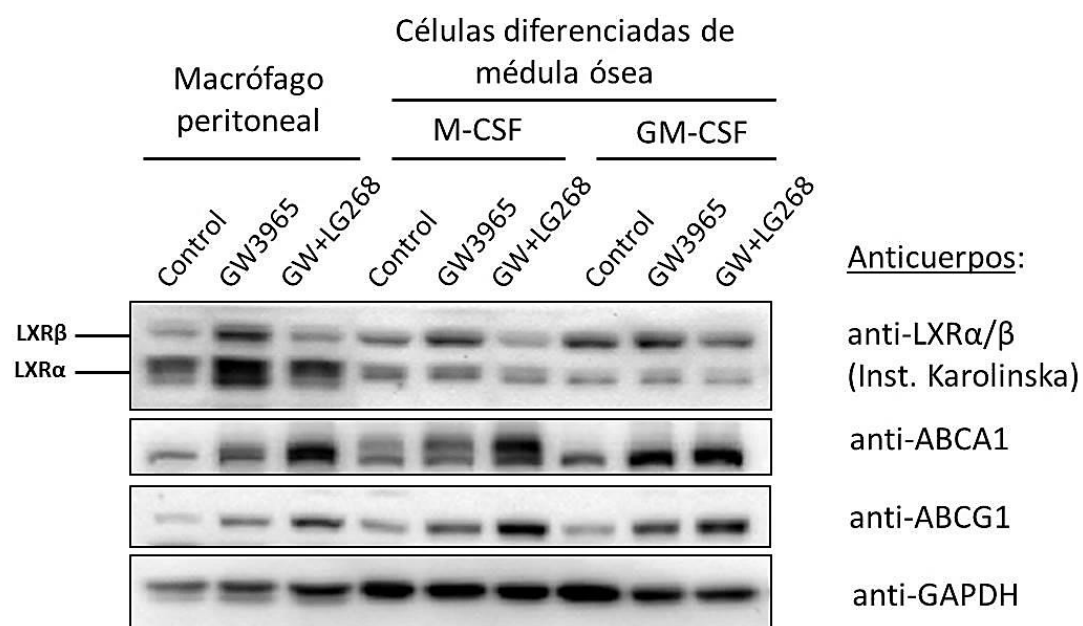


Figura 33. Expresión de las proteínas LXR α y LXR β en macrófagos primarios peritoneales y diferenciados de médula ósea de ratón. La expresión de las proteínas LXR y de los principales genes diana de LXR tras el tratamiento con el agonista de LXR o en combinación con el agonista de RXR fue examinada por western blot. En (A) se muestran extractos proteicos de células WT y LXR DKO diferenciadas de médula ósea con las citoquinas M-CSF (CSF1) o GM-CSF. En (B) se muestra la expresión de ambos receptores LXR tanto en macrófagos primarios peritoneales como en células diferenciadas de médula ósea, reconocidos con el anticuerpo policlonal.

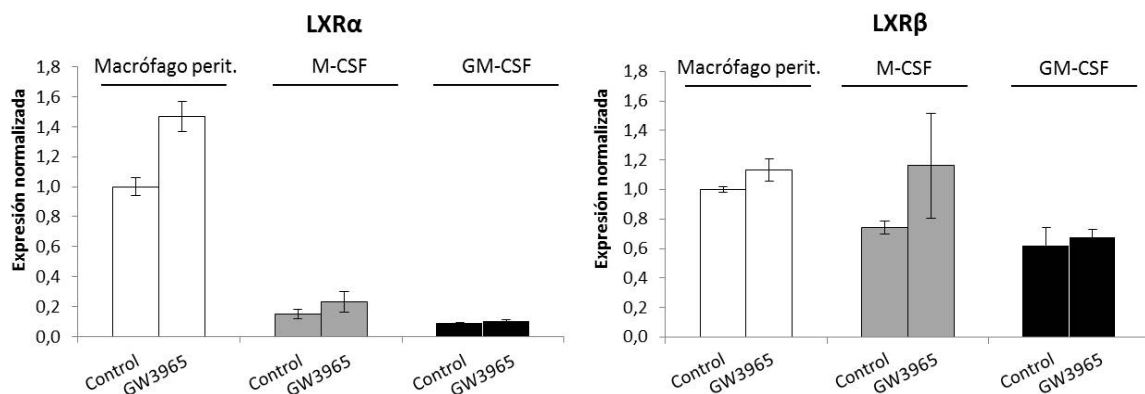


Figura 34. Expresión de LXR α y LXR β en macrófagos primarios peritoneales y diferenciados de médula ósea de ratón. Los niveles de expresión de LXR α y LXR β en condiciones control o en presencia del agonista de LXR, fue examinada por qPCR. Se muestra la expresión de macrófagos primarios peritoneales y células diferenciadas con las citoquinas M-CSF (CSF1) y GM-CSF, relativizada a los niveles de expresión en macrófagos peritoneales. Se muestra un experimento representativo de cada uno y sobre cada barra la desviación estándar de los triplicados realizados en la amplificación por qPCR.

7. Aplicación de la tecnología CRISPR para la delección de sitios de unión de LXR en genes diana.

La tecnología CRISPR ha surgido en los últimos años como la herramienta más importante para la modificación del genoma eucariótico de forma conveniente. Uno de los usos más frecuentes es la generación de animales o células deficientes en la expresión de uno o más genes concretos de interés, a base de producir cortes en localizaciones precisas del genoma que más tarde se repararán con la maquinaria celular.

Haciendo uso de esta característica de esta tecnología utilizamos la herramienta CRISPR para obtener información valiosa acerca de los sitios precisos en el genoma que rigen la regulación transcripcional de genes diana de LXR.

7.1. Delección de la localización genómica de LXR en la zona reguladora de la expresión del gen *Mylip*.

Iniciamos el estudio y aplicación de la técnica de CRISPR induciendo la alteración de la secuencia canónica de unión de LXR en la zona reguladora de la expresión el gen diana conocido *Mylip*, que cuenta con un solo sitio de unión de los receptores LXR situado entre los exones 2 y 3 (Fig. 35).

Resultados

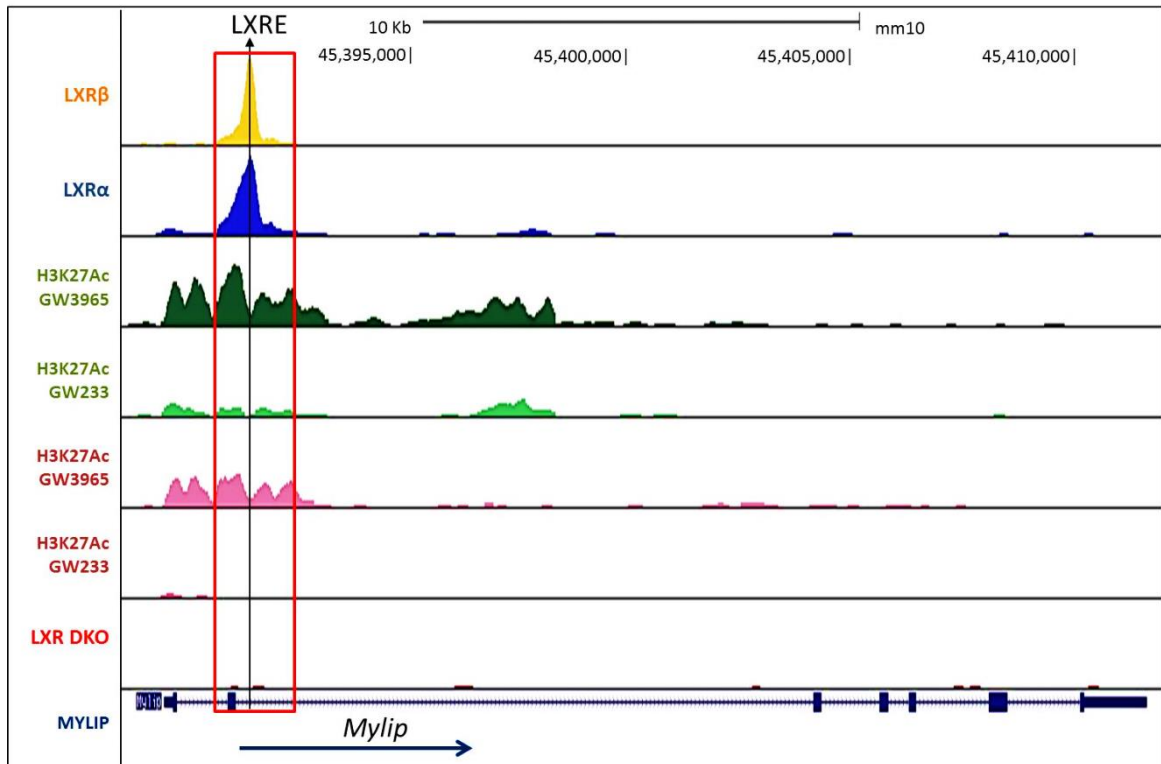


Figura 35. Localización en el gen diana de LXR *Mylip* de la región reguladora de la transcripción conteniendo la secuencia consenso de unión de LXR (LXRE) para la delección con la tecnología CRISPR. Visualización del gen *Mylip* con Genome Browser donde se señala el sitio de unión de LXRα y LXRβ, así como las marcas de acetilación, detectadas por ChIP-seq en cada una de las líneas inmortalizadas de macrófago. Se recuadra la región genómica de interés seleccionada para la delección por tecnología CRISPR de la secuencia consenso de unión de LXR (LXRE).

Resultados

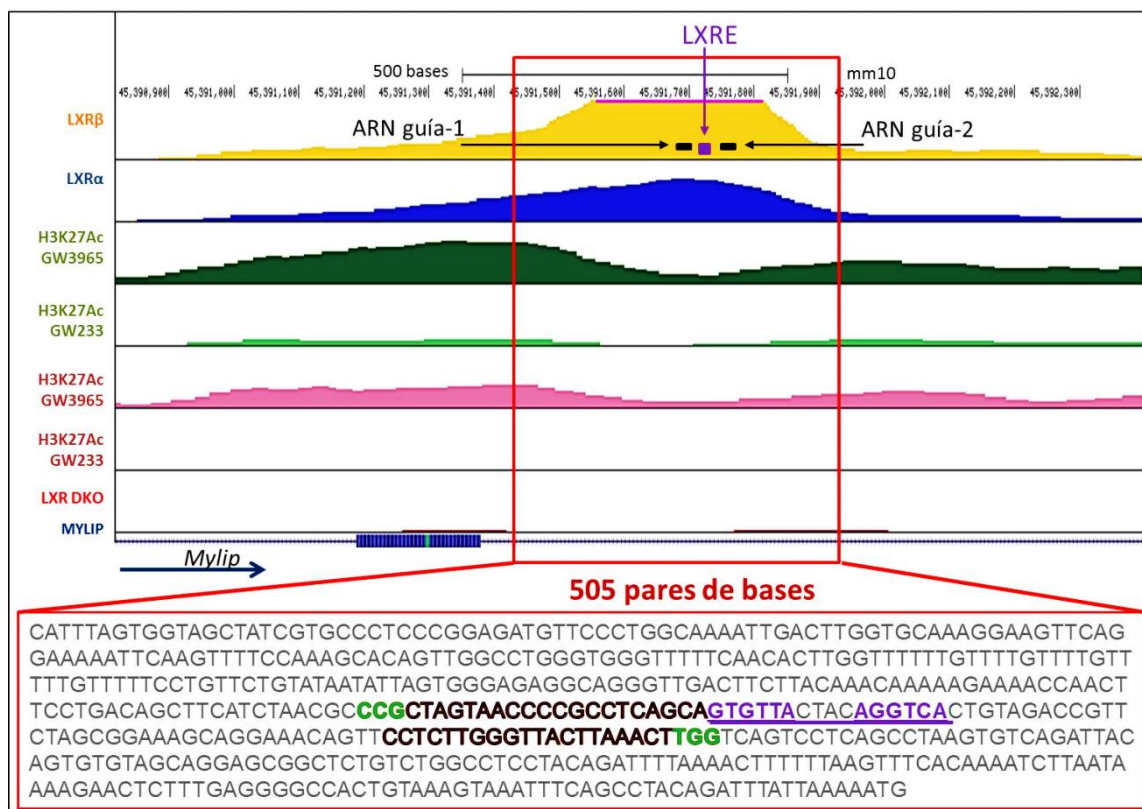


Figura 36. Secuencia de ADN de la región reguladora de la transcripción del gen *Mylip*, seleccionada para el diseño de ARN guía. La secuencia de 505 pares de bases que contiene el motivo de unión de LXR (subrayado en púrpura) y su posicionamiento en el gen *Mylip* se muestra recuadrada. Esta secuencia se empleó para el diseño de los ARN guía con la que se dirigió la maquinaria molecular de corte para deletar la secuencia consenso LXRE con la tecnología CRISPR. Las posiciones relativas de la unión de los ARN guía y el motivo LXRE se muestran en la parte superior de la imagen. La secuencia completa de los ARN guía se resalta en rojo dentro del cuadro y en verde la secuencia PAM.

Para ello elegimos una secuencia de 505 pares de bases que cubrían holgadamente la región de unión de la proteína LXR, obtenida a partir de nuestros resultados de ChIP-seq, sobre la cual diseñamos dos ARN guías que dirigen la proteína de corte, Cas9n, próximos a ambos lados de la secuencia consenso de unión de LXR, detectada con el programa DNASTAR Lasergene 6.1 (Fig. 36) (ver material y métodos). Aplicamos la técnica de CRISPR sobre células RAW 264.7. La elección de esta línea celular para la aplicación de esta técnica viene determinada por su gran capacidad de división, y que la expresión de *Mylip* es ampliamente inducida por la activación de LXR. Transfectamos esta línea celular con dos tipos de plásmidos pX461, conteniendo cada uno un ARN guía inserto y el gen de la Cas9n (ver sección de material y métodos). Como resultado obtuvimos una eficiencia de transfección baja, del orden del 1% (Fig. 37). Sin embargo, tras la disgregación a células aisladas se lograron cultivar algunos clones derivados de una sola célula con éxito, alrededor de un 20% de los clones cultivados se logró la eliminación de la secuencia deseada mediante la técnica de CRISPR el sitio de unión.

Resultados

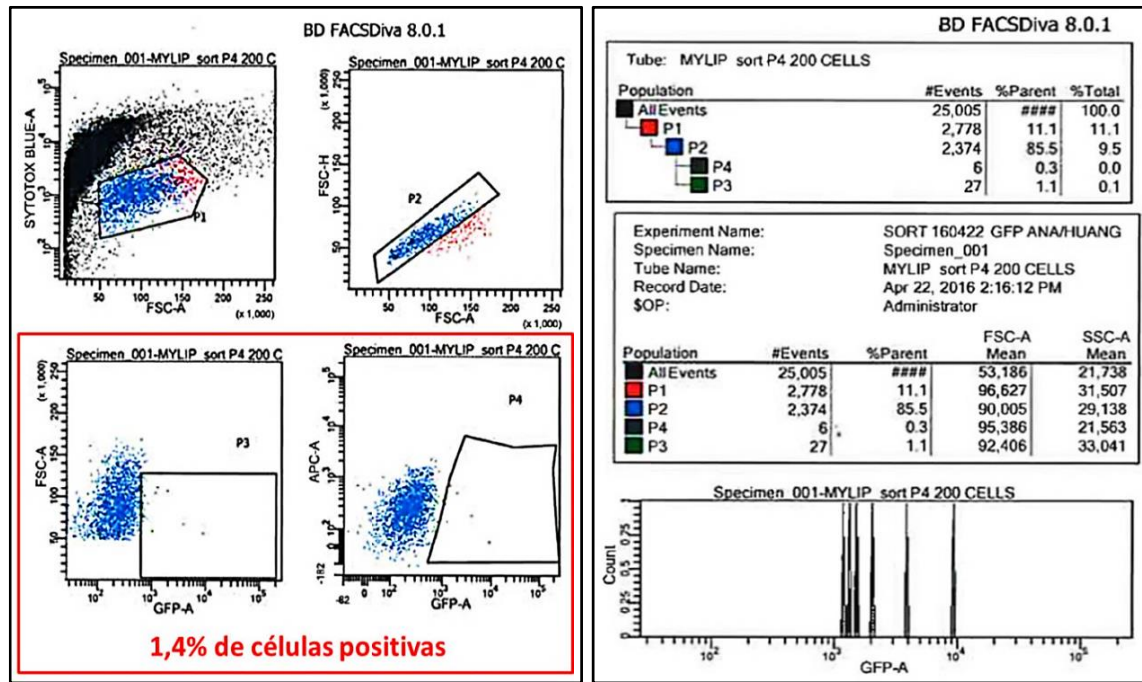


Figura 37. Selección de células positivas para los ARN guía en las células RAW 264.7.

Gráficos obtenidos por el programa del citómetro separador celular FACSaria II, con el que se seleccionaron las células RAW 264.7 que habían adquirido el plásmido pX461 conteniendo los ARN guía para la delección del motivo consenso de unión de LXR y la proteína verde fluorescente (GFP). Se muestran los porcentajes de células de cada población de interés delimitada en el gráfico, siendo las poblaciones 3 y 4 (P3 y P4) las que contienen las células positivas para la adquisición (en total 200 células), identificadas por la expresión de GFP.

La identificación de posibles regiones delecionadas se llevó a cabo con electroforesis en gel de agarosa al 2,5% de productos de amplificación por PCR de ADN genómico, amplificados con cebadores específicos de unión alejada y flanqueando la región diana para la delección con la herramienta CRISPR (Fig. 38). Se produjeron dos bandas de amplificación en el gel de distinta longitud, producto de la desigual acción de la maquinaria de reparación celular sobre los dos alelos expuestos al corte. Una banda de ADN más ligera cuenta con aproximadamente 400 pares de bases tras la amplificación y la otra aproximadamente 200 pares de bases, las cuales tras la secuenciación del ADN extraído del gel correspondieron con unas delecciones de 108 y 281 pares de bases respectivamente (Fig. 39). La visualización de la localización y extensión de las delecciones producidas se representa en 2D con la herramienta Genome Browser (Fig. 40).

Resultados

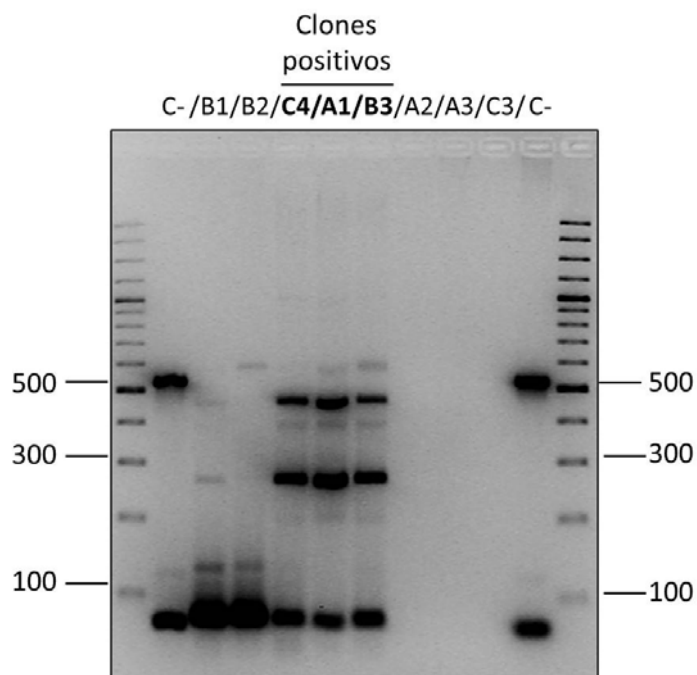


Figura 38. Identificación de clones celulares positivos para la delección por CRISPR del motivo de unión de LXR en el gen *Myip*. Electroforesis en gel de agarosa al 2,5% con los productos de amplificación del ADN genómico de distintos clones aislados. Las bandas a la altura de aproximadamente 500 pares de bases representan las secuencias del gen *Myip* intacta, se aprecia en los tres clones señalados como positivos que la banda de 500 pares de bases ha desaparecido y en su lugar hay otras dos de idéntico tamaño en los tres clones.

A

Delección de 108 pares de bases:

5'-CATTTTAAATAATCTGTAGGCTGAAATTTACTTTACAGTGGCCCTCAAAGAGTTCTTTTATTAAGATTTGTGA
AACTTAAAAAAGTTTAAAAATCTGTAGGAGGCCAGACAGAGCCGCTCTGTACACACTGTAATCTGACACTTAGG
CTGAGGACTGACCAAGTTTAAGTAACCAAGAGGAAGTGT [redacted]
[redacted]T
GTAAGAAGTCAACCCTGCCTCTCCCACTAATATTATACAGAACAGGAAAAACAAAAACAAAAACAAAAAAC
CAAGTGTGAAAAACCCACCCAGGCCAACTGTGCTTTGGAAAACCTGAATTTTCCTGAACCTCCTTGCACCAAG
TCAATTTGCCAGGGAACATCTCCGGGAGGGCACGATAGCTACCACTAAATG-3'

B

Delección de 281 pares de bases:

5'-CATTTTAAATAATCTGTAGGCTGAAATTTACTTTACAGTGGCCCTCAAAGAGTTCTTTTATTAAGATT [redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted]AACAAAAACAAAAACAAAAACAAAAAAC
CAAGTGTGAAAAACCCACCCAGGCCAACTGTGCTTTGGAAAACCTGAATTTTCCTGAACCTCCTTGCACCAAG
TCAATTTGCCAGGGAACATCTCCGGGAGGGCACGATAGCTACCACTAAATG-3'

Figura 39. Extensión de las delecciones realizadas con CRISPR sobre la región genómica que contiene el motivo LXRE en el gen *Myip*. Secuenciación de la región genómica sobre la que se logró deleccionar con CRISPR la secuencia de unión de la proteína LXR en la región reguladora del gen *Myip*. Con barras negras se muestra la extensión de las delecciones en cada alelo del gen en células RAW 264.7: 108 pares de bases (A) y 281 pares de bases (B).

Resultados

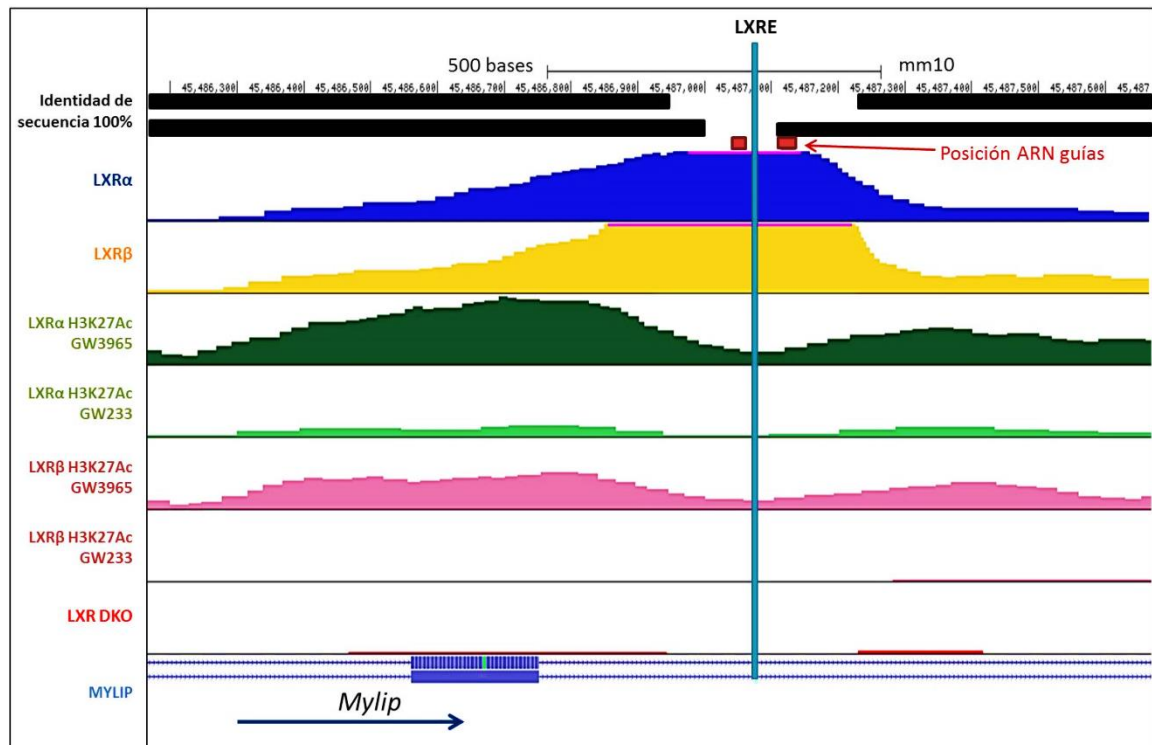


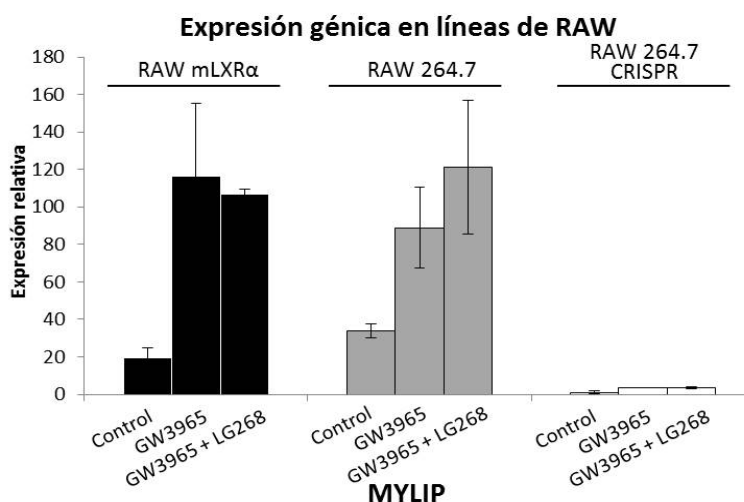
Figura 40. Esquema de las secuencias más relevantes para el experimento de delección con CRISPR sobre la secuencia reguladora de la transcripción del gen *Mylip*. Se muestra una representación con la región genómica reguladora del gen *Mylip*, obtenido con la herramienta Genome Browser, en la que se esquematizan las posiciones del motivo de unión de LXR (LXRE) y la unión de los ARN guía. En la parte superior se muestran los resultados de las secuenciaciones de los dos alelos de *Mylip* afectados por la delección con CRISPR.

Adicionalmente a la verificación de la secuencia obtenida tras la delección con la tecnología CRISPR y la localización en el genoma de la extensión de las delecciones obtenidas, resulta imprescindible la comprobación funcional y transcripcional de los genes afectados por la delección. La amplificación por qPCR del RNA mensajero correspondiente al gen *Mylip* en las líneas celulares RAW 264.7, RAW 264.7 que expresa LXRα murino (RAW mLXRα) y RAW 264.7 sometido a delección del sitio regulador de LXR con CRISPR reveló que en estas últimas células la inducción de la transcripción del gen *Mylip* es prácticamente inexistente en presencia del ligando sintético de LXR (GW3965) o en combinación con el ligando sintético específico de RXR (LG268) (Fig. 41A). La expresión de este gen en las otras dos líneas RAW 264.7 responde al tratamiento con los ligandos, aumentando progresivamente hasta un máximo relativizado de 120. Examinando otra diana específica de LXR, como es *Srebf1* se comprueba que su expresión no está comprometida en las células sometidas a delección con CRISPR y correlaciona con la presencia de los agonistas, aumentando hasta 20 veces y hasta más de 40 veces con respecto a la expresión del gen de referencia *36b4* en la línea RAW 264.7 mLXRα (Fig. 41B). Por ello, podemos concluir que la eliminación de la secuencia de unión de LXR en la región reguladora de *Mylip*, afecta a la expresión de este, pero no de otros genes.

Resultados

Examinamos la actividad de la proteína Mylip con el seguimiento de la degradación del receptor de colesterol LDL (LDLR), su diana celular descrita por Zelcer y colaboradores (Zelcer et al., 2009) detectado por western blot en las células RAW 264.7, RAW 264.7 que expresan LXR α murino y RAW 264.7 portando la delección CRISPR, en presencia de GW233, DMSO, GW3965 y GW3965 con LG268. Se comprobó una disminución en la expresión de LDLR, detectada por la decreciente intensidad en la banda de proteína correspondiente a LDLR con los tratamientos, siendo más acusada la degradación en el genotipo de RAW mLXR α . En las células RAW portando la delección de CRISPR se aprecia que la banda proteica de LDLR tiene una constante intensidad bajo todos los tratamientos aplicados, revelando una ausencia total de degradación de la proteína (Fig. 42).

A



B

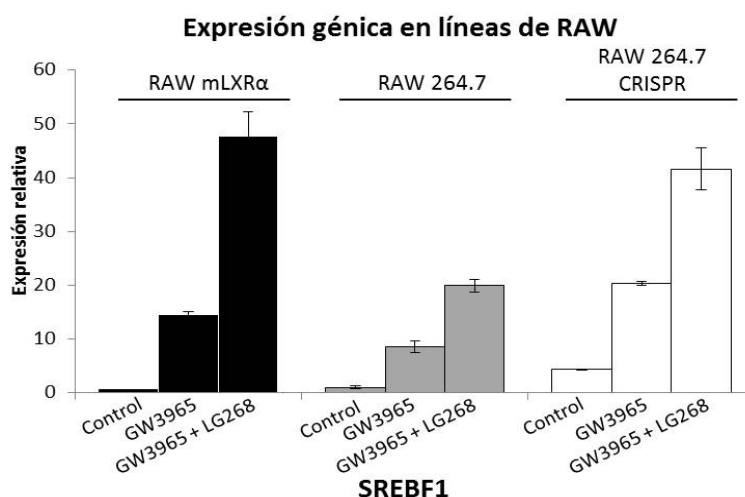


Figura 41. La delección del motivo de unión de LXR en el gen *Myip* inactiva el control transcripcional de LXR sobre este gen. Regulación de los genes *Myip* (A) y *Srebf1* (B) en las células RAW264.7 (gris), RAW 264.7 que expresan LXR α murino (blanco) y RAW 264.7 tras la delección con CRISPR del motivo consenso de unión de LXR (negro), tras el tratamiento con el agonista sintético de LXR (GW3965) o en combinación con el agonista de RXR (LG268). Se muestra un experimento representativo de 3 independientes y en cada barra la desviación estándar de los triplicados realizados en la amplificación por qPCR.

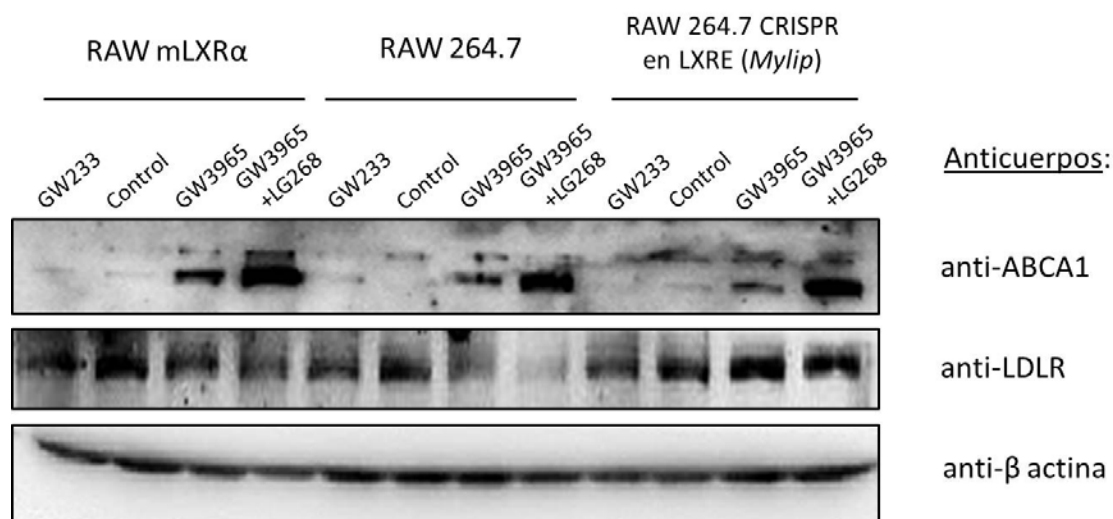


Figura 42. La delección del sitio de unión de LXR en el gen *Myliip* suprime su efecto sobre la degradación del receptor de LDL. La degradación de la proteína receptora de LDL mediada por Myliip en condiciones de activación de LXR con su agonista sintético (GW3965) o en combinación con el agonista de RXR (LG268) fue examinada por western blot. Los extractos proteicos fueron obtenidos de células RAW 264.7, RAW 264.7 que expresan LXR α murino y RAW 264.7 tras la delección con CRISPR del motivo consenso LXRE. Se muestra una imagen de western blot representativa de 5 experimentos independientes.

7.2. Delección del sitio de unión de LXR en el *enhancer* del gen *Aim*.

En vista de los resultados obtenidos hasta el momento con la tecnología CRISPR decidimos aplicar los conocimientos adquiridos al estudio del sitio regulador de la transcripción del gen *Aim* (*Cd5l*). Este gen es el único conocido regulado exclusivamente por LXR α y se sabe que existe una secuencia de unión LXR α específico, pero no está clara su posición exacta en el genoma.

Examinando la información obtenida referente al cistroma de las proteínas LXR α y LXR β con Genome Browser, observamos que en la región *enhancer* del gen *Aim* existe una unión diferencial de las proteínas LXR, que es más acusada en la secuencia más alejada con respecto al gen, a 24Kb de distancia del inicio de la transcripción de *Aim*. Se trata de la única localización en la que la unión de LXR β es menos conspicua, lo que podría ser indicativo de la secuencia específica de unión de LXR α desde donde se regula la expresión de este gen (Fig. 43).

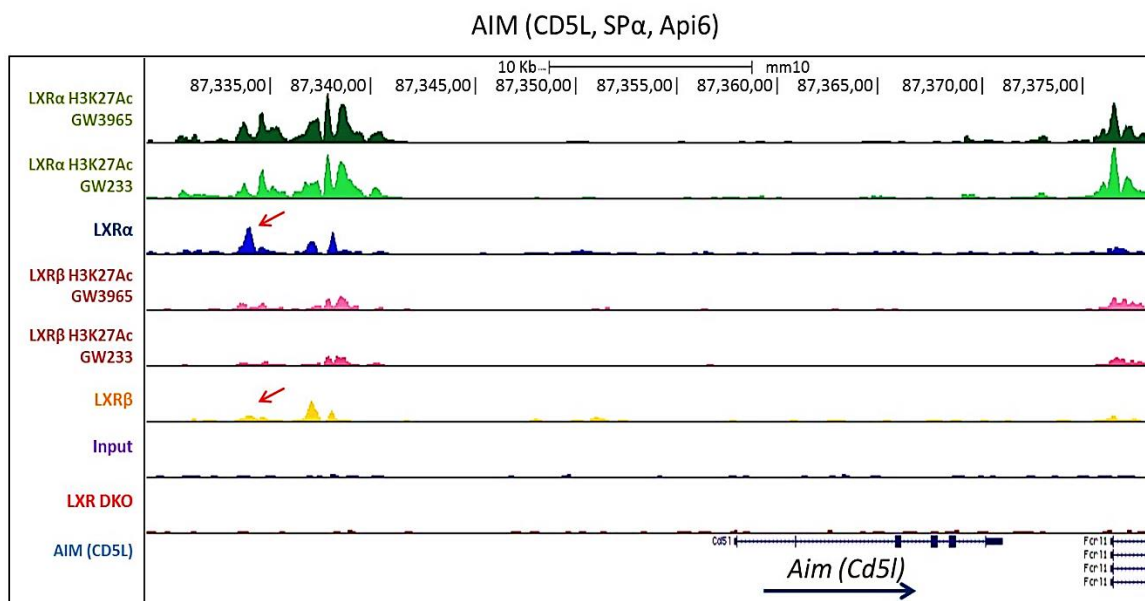


Figura 43. Posición de la región potenciadora de la transcripción o *enhancer* del gen *Aim* (*Cd5l*). Representación de la región genómica del gen *Aim*, realizada con la herramienta de visualización Genome Browser, donde se muestra la posición del *enhancer* con la unión de los receptores nucleares LXR, así como las marcas de acetilación en la lisina 27, predominantes en la línea 3FLAG-LXR α . La ubicación de la posible secuencia de unión específica de LXR α en el *enhancer* de *Aim* está indicada con flechas rojas.

El diseño de ARN guías para la delección de esta región genómica, al igual que se realizó sobre el gen *Myliip*, se hizo en base a una secuencia de 898 pares de bases, que se extendían incluyendo la región con unión detectable de LXR α por ChIP-seq (Fig. 44). Se identificó la secuencia exacta del elemento de respuesta a LXR (LXRE) en las 898 pares de bases seleccionadas con el programa DNASTAR Lasergene 6.1. De igual modo que se hizo con el gen *Myliip*, se empleó la misma página web para el diseño de los ARN guía (ver sección de material y métodos).

Elegimos para la transfección las células de la línea celular generada en nuestro laboratorio: RAW 264.7 que expresa LXR α murino, por presentar unos altos niveles de expresión del receptor LXR α , así como una elevada inducibilidad de la expresión del gen *Aim*. En este caso, no pudimos recuperar células que hubieran sufrido una delección en el *enhancer* del gen *Aim* por el sistema CRISPR (datos genómicos no mostrados) y actualmente nos encontramos trabajando en su obtención.

Resultados

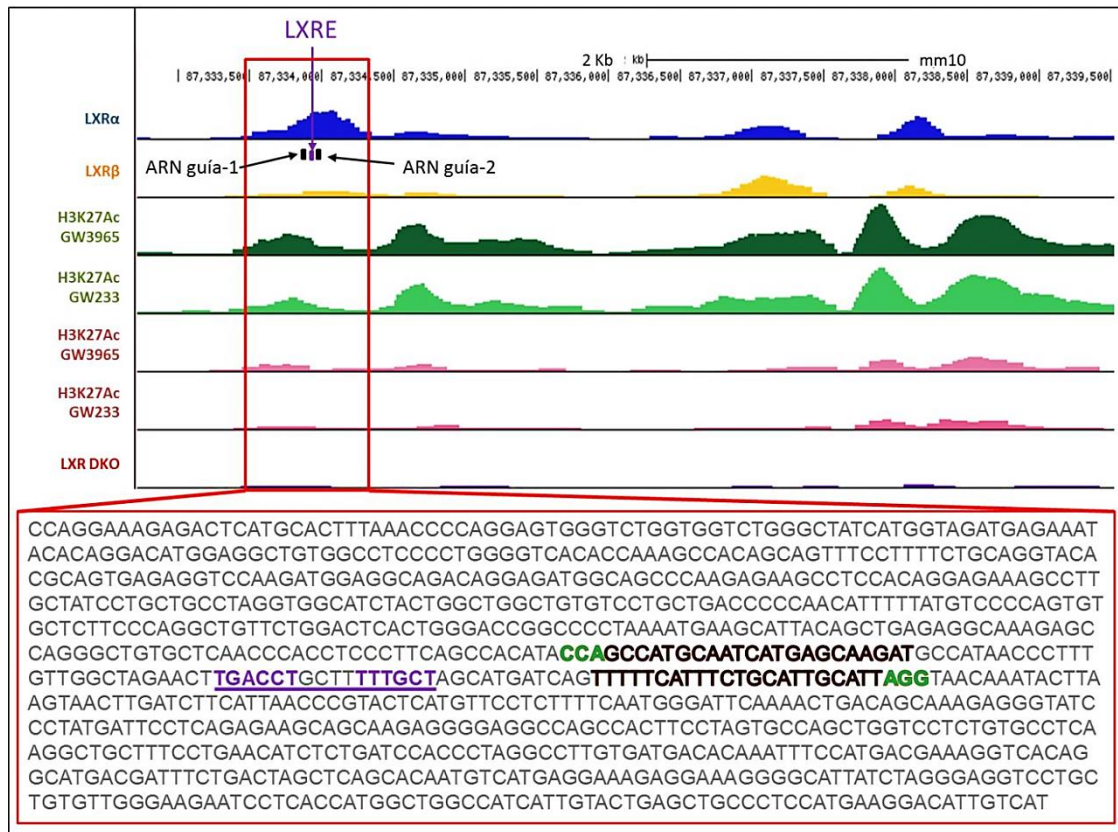


Figura 44. Esquema de las posiciones relativas de las secuencias más relevantes para la delección con CRISPR del *enhancer* regulador de la expresión de *Aim*. Posiciones en la región potenciadora de la transcripción o *enhancer* de *Aim* de la secuencia consenso de unión de LXR (LXRE, subrayado en púrpura) y las secuencias de ARN guía diseñadas para la delección por CRISPR. En el recuadrado se muestra la secuencia de 898 pares de bases seleccionadas para el diseño de los ARN guía. En ella, la secuencia de los ARN guía se destaca en rojo acompañada de las secuencias PAM en verde. La escala de las marcas obtenidas por ChIP-seq es 25 en todos los casos.

8. Identificación de la secuencia de unión de LXRα en el *enhancer* del gen *Aim* mediante unión *in vitro* a oligonucleótidos biotinilados.

De manera complementaria a los estudios de CRISPR en la zona reguladora del gen *Aim*, planeamos unos ensayos *in vitro* para verificar que la secuencia identificada como específica de unión de LXRα en la región potenciadora de la transcripción del gen *Aim* es efectivamente unida preferentemente, si no exclusivamente, por el receptor LXRα.

Diseñamos 3 tipos de oligonucleótidos biotinilados conteniendo la secuencia verificada, basada en nuestros datos genómicos de ChIP-seq, de los sitios de unión de LXR en la cercanía de dos genes diana: *Abca1* y *Aim*, así como un tercer oligonucleótido de control con una secuencia de nucleótidos idéntica a la del *enhancer* de *Aim*, pero sustituyendo el elemento LXRE por

Resultados

nucleótidos al azar. Estos oligonucleótidos fueron incubados con extractos nucleares proteicos de células HEK293 que expresan LXR α unido a la secuencia FLAG.

Se detectó claramente la unión de FLAG-LXR α a la secuencia correspondiente del gen *Abca1* y también a la secuencia potencialmente exclusiva de unión de LXR α dentro del *enhancer* del gen *Aim*, localizada en el mismo peso correspondiente a la unión de la proteína LXR α en el gen *Abca1* (Fig. 45). En cambio, como era esperable, no se producía unión del receptor al oligonucleótido del *enhancer* de *Aim* de secuencia alterada.

Actualmente nos encontramos en proceso de llevar a cabo repeticiones de este experimento empleando las líneas celulares de macrófago que expresan uno de los receptores LXR, generadas en nuestro laboratorio, pero por motivos de tiempo no han podido ser incluidas en la presente Tesis Doctoral.

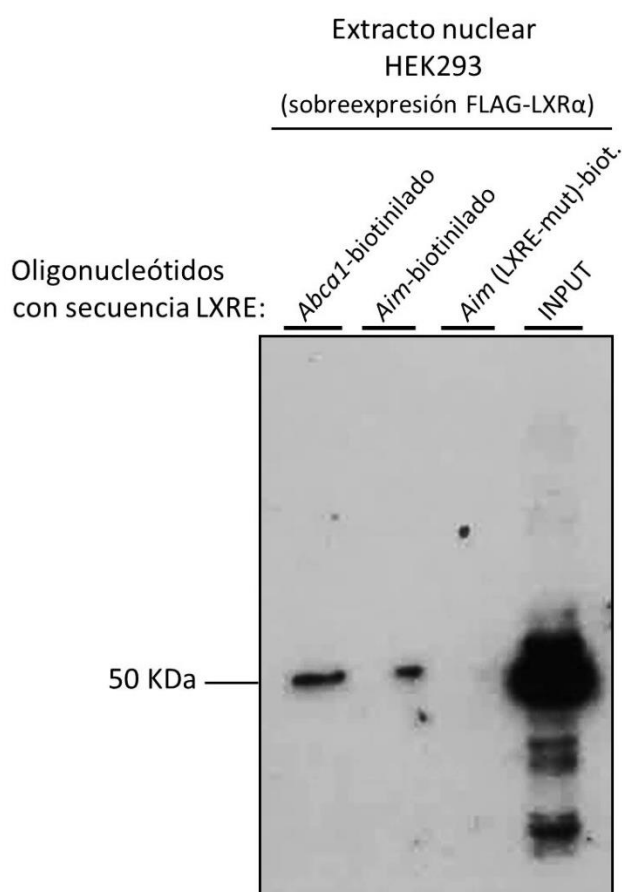


Figura 45. El receptor nuclear LXR α une la secuencia consenso LXRE localizada en el *enhancer* del gen *Aim*. Western blot de oligonucleótidos biotinilados conteniendo la secuencia consenso de unión de LXR localizada en los genes *Abca1* y el *enhancer* de *Aim* o alternativamente, esta secuencia alterada. Se realizó una exposición de los oligonucleótidos a extractos nucleares de expresión del receptor LXR α unido al polipéptido FLAG. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes.

TABLAS

TABLA I.

Símbolo oficial	Magnitud de cambio en expresión		
Abcg1	35,686	Gm15687	2,159
Abca1	14,009	Zbtb10	2,143
Mylip	11,114	Al987944	2,134
Scd1	6,413	Ccdc182	2,132
Scd2	5,227	Gm5431	2,116
Trav6-3	3,505	Il11ra1	2,115
H2-T10	2,918	Olfr763	2,103
Mfap1a	2,902	Zfp930	2,092
Gstm1	2,827	Plau	2,084
Acaca	2,701	Eid2	2,083
Cyp4f17	2,636	Gm15351	2,081
Nr1d2	2,622	Gbp2	2,079
Zfp960	2,608	Kbtbd8	2,070
Maged1	2,510	Ifi44l	2,068
Hydin	2,490	Tceal3	2,059
Clvs2	2,480	Obox7	2,055
Fasn	2,442	Slfn5	2,049
Csf1	2,420	Scd3	2,048
Alox15	2,361	Zfhx3	2,048
Gm10731	2,337	n-R5s165	2,045
Gm14967	2,312	Olfr656	2,040
Olfr706	2,305	Rps2	2,033
D930048N14Rik	2,302	Nlrp4c	2,032
Zfp608	2,288	Ube2v2	2,031
Zfp992	2,287	Lpcat3	2,029
Cela3b	2,274	Fgr	2,025
Srebf1	2,259	Gm3250	2,010
Stxbp3b	2,221	Slc7a15	2,009
Rnf32	2,179	Zfp994	2,008
Il1a	2,170	C77080	2,006
Slc6a21	2,163	Scn3b	2,002
		Apol7e	2,000

Tabla I. Genes regulados por los tratamientos farmacológicos con el agonista GW3965 y el antagonista GW233 en la línea celular 3FLAG-LXR α . Los 63 genes identificados por microarrays que experimentan una magnitud de cambio en su expresión con los tratamientos farmacológicos, mayor o igual a 2 en la línea 3FLAG-LXR α se relacionan en orden según la magnitud de su expresión.

TABLA II.

Símbolo oficial	Magnitud de cambio en expresión
Abca1	14,907
Myliip	11,419
Scd1	9,422
Abcg1	8,974
Lbp	7,679
Apoc2	5,747
Scd2	4,813
Orm3	4,632
Il1a	4,280
Srebf1	3,487
Arl4c	3,081
Lpcat3	2,857
Eepd1	2,613
Fasn	2,578
Olfr446	2,571
Apoe	2,565
Slc22a13b-ps	2,471
H2-Q6	2,399
Sdc3	2,380
Ap5s1	2,355
Mir1970	2,309
Acsl3	2,218
Abi3	2,212
mmu-mir-297a-2	2,195
AB124611	2,181
Trem12	2,161
Gramd1b	2,157
Mafb	2,157
Gm10410	2,145
Traj46	2,091
Csprs	2,052
Mfsd2a	2,046
Mid1ip1	2,013
Rps13	2,011

Tabla II. Genes regulados por los tratamientos farmacológicos GW3965 y GW233 en la línea celular 3FLAG-LXR β . Los 34 genes identificados por microarrays que experimentan una magnitud de cambio en su expresión, con los tratamientos farmacológicos, mayor o igual a 2 en la línea 3FLAG-LXR β se relacionan en orden según la magnitud de su expresión.

TABLA III.

Símbolo oficial	Magnitud de cambio en expresión
Il1f9	84,236
Slfn4	76,871
Ifitm3	61,703
Scd1	47,759
Csf3	42,174
Csprs	41,326
Cd59a	38,013
Gm5483	37,567
Ctse	36,351
Car5b	33,953
Ly86	33,753
Ifi44	33,304
Dusp6	31,651
Lix1	30,081
Itgb7	30,033
Ltb	29,343
Pltp	29,187
Trem3	27,922
Dhcr24	25,927
Ehd2	24,784
Pdgfb	24,386
Olfm1	23,420
Urah	23,191
Ripk3	22,388
Ccnd2	22,223
Nxf7	22,204
Socs3	22,203
Smagp	21,091
Layn	20,910
Zbp1	20,772
Apol9b	20,673
Tmem26	20,626
Cda	19,819
Qsox1	19,776
Scimp	19,300
Tmem171	18,651
Tm7sf3	18,551
Fam167b	17,279
Tmem98	17,126
Cxcl16	16,742
A530040E14Rik	16,713
Stfa3	16,547
Gm5416	16,468
Aqp9	16,412
Phlda1	15,700
St3gal6	15,532

Car2	14,986
As3mt	14,892
Pdcd1	14,532
Trem1	13,991
Pdpn	13,977
Gstp3	13,610
Ifi27l2a	13,533
Plet1	13,512
Reep6	13,113
Edn1	12,559
Cd80	12,554
Cxcl2	11,537
Gstt1	11,347
Galnt3	11,246
Pcdh7	10,751
Serpine1	10,531
Adcy2	10,526
lsg15	10,444
Ifi202b	10,099
Fgr	10,023
Stfa2l1	9,961
Il18rap	9,682
Lamc1	9,530
Il17ra	9,256
Il17rc	9,252
Pla1a	9,233
Csn1s1	9,126
Ighm	9,045
Mela	9,036
Cyp2c55	9,008
Myc	8,983
Atp6v0e2	8,855
Ccnd1	8,829
Egr1	8,750
Nos2	8,678
Tfcp2l1	8,678
Hmga2	8,655
Plk3	8,626
Ppm1l	8,606
Rasal3	8,588
Syn1	8,531
Slpi	8,501
Gm10499	8,416
Stk40	8,234
Adam8	8,132
Chac1	8,122
Sdc4	8,003

Resultados

Lpcat4	7,909
Pla2g5	7,844
Dcstamp	7,831
Ndr2	7,804
Atp2a3	7,713
Apol9a	7,706
Plaur	7,639
Tubb6	7,625
Fads2	7,542
Ubp1	7,395
Zbtb32	7,346
Nr1h2	7,303
Zc3h12d	7,260
Il1f6	7,220
Dusp5	7,177
Jdp2	7,084
Fos	7,079
Irf7	7,055
Gstt4	7,034
Ppm1j	7,007
Spred3	7,006
Slfn1	6,974
Cfb	6,951
H2-Q5	6,951
Zfp36	6,931
Il6	6,886
Atp2b4	6,874
Oasl1	6,712
Cdk2ap2	6,703
Ccl4	6,697
Dcn	6,682
Fxyd2	6,656
H2-Q9	6,625
Gstp2	6,582
Sesn2	6,568
Vegfc	6,457
Themis2	6,444
Sdc3	6,429
Hid1	6,416
Fam129a	6,409
Csf2	6,395
Il1b	6,386
Cd72	6,381
Fah	6,346
Sdr39u1	6,258
Slc1a4	6,257
Enpp4	6,201

Hsh2d	6,167
B630019K06Rik	6,154
Map3k5	6,135
Tshz3	6,098
Ptpn5	6,079
Trib3	6,075
Gm11545	6,052
Bst1	6,026
F2rl2	5,956
Hal	5,792
Sema4c	5,755
Gstp1	5,738
Mapk11	5,685
Fcgr1	5,569
Abtb2	5,565
Slc6a4	5,544
Mylip	5,511
Pkd1l2	5,510
Abhd1	5,506
Gm10825	5,486
Agpat9	5,474
2510009E07Rik	5,462
Rnf183	5,435
Il1rl1	5,414
Upp1	5,399
Rhod	5,384
Sccpdh	5,347
Gch1	5,307
Fosl2	5,293
Mycn	5,220
B430306N03Rik	5,215
Adora2b	5,214
Gm9855	5,187
Sema4a	5,182
Hoxc6	5,179
Pafah1b3	5,152
Il1rn	5,143
Mustn1	5,126
Kif5a	5,125
Nudt22	5,112
Endod1	5,100
Pros1	5,086

Tabla III. Genes expresados en la línea celular 3FLAG-LXR α de forma destacada en referencia al genotipo control LXR DKO. Los 182 genes identificados por microarrays que experimentan una magnitud de cambio en su expresión mayor o igual a 5 en la línea 3FLAG-LXR α con la referencia al genotipo LXR DKO se relacionan en orden según la magnitud de expresión.

TABLA IV.

Símbolo oficial	Magnitud de cambio en expresión		
Cd55	24,722	Mertk	2,906
Slc9a7	9,941	Ccdc85c	2,836
Itgax	9,647	Ripk3	2,689
H2-Ab1	9,270	Cnn3	2,685
Ffar4	8,682	Ina	2,658
Trem12	7,998	Nlrp5	2,655
Apoc2	7,149	C130050O18Rik	2,645
Klk1b27	6,817	Cish	2,638
Btla	6,511	Kmo	2,594
Myip	6,321	Il1a	2,546
Orm3	6,146	Serpina3f	2,535
Scd1	6,084	Slc16a7	2,532
Clec10a	5,807	Nxn	2,532
H2-Eb1	5,803	Jup	2,515
H2-DMa	5,404	Neur13	2,512
Klk1b11	5,283	Srebf1	2,512
Sulf2	4,946	Tspan10	2,500
Klk8	4,927	Ifi27l2a	2,493
Hpse	4,884	Slc39a10	2,484
Mgl2	4,606	P2ry13	2,484
Klk1b22	4,534	Sema4a	2,481
Tns1	4,358	H2-Oa	2,479
Apoe	4,016	Chst10	2,447
Lbp	3,995	Peli2	2,414
Ifi44	3,943	Fasn	2,410
Slamf8	3,838	Acy1	2,381
Arl4c	3,711	Gm13583	2,349
Cyp4f18	3,658	Sac3d1	2,323
F10	3,572	Scgb1a1	2,320
Hapln4	3,561	Epha6	2,290
Orm1	3,556	Tcam1	2,289
Abi3	3,492	2810025M15Rik	2,265
1700048O20Rik	3,470	Acsl3	2,261
Mfsd2a	3,439	Eepd1	2,250
Tifab	3,405	Polr2l	2,238
Scimp	3,315	Cyp27a1	2,230
Ciita	3,242	Trf	2,227
Chit1	3,137	Kank1	2,211
Gtpbp3	3,047	Pdgfra	2,203
Pros1	3,007	Fbxo32	2,201
Rgs12	3,005	Mppe1	2,201
Napsa	2,986	Il10ra	2,195
Klhl38	2,939	Them6	2,188
B430306N03Rik	2,936	Ctsh	2,183
		Rapsn	2,171
		Cd200r2	2,160

Resultados

Slc7a7	2,156
Chn2	2,155
Eng	2,150
Extl1	2,143
Gm6020	2,137
Ccl6	2,131
Abcg1	2,126
Nop56	2,115
Lrrc1	2,109
Angptl4	2,103
Ptgs1	2,101
Isyna1	2,083
Adam39	2,081
Ncam2	2,077
Isg15	2,074
Pdk3	2,063
Orm2	2,063
Slc19a1	2,060
Vegfa	2,055
Adssl1	2,052
Pou3f1	2,046
Insrr	2,040
Evl	2,040
Ucn2	2,038
Sesn2	2,031
Lpin1	2,031
Fzd7	2,027
B4galnt1	2,018
Ksr2	2,012
Foxred1	2,011
C030006K11Rik	2,009
Slc2a6	2,005
Rab27a	2,002

Tabla IV. Genes expresados en la línea celular 3FLAG-LXR β de forma destacada en referencia al genotipo control LXR DKO. Los 123 genes identificados por microarrays que experimentan una magnitud de cambio en su expresión mayor o igual a 2 en la línea 3FLAG-LXR β con la referencia al genotipo LXR DKO se relacionan en orden según la magnitud de expresión.

TABLA IV.

Símbolo oficial	Magnitud de cambio en expresión		
Atp6v0d2	286,368	Mapkapk3	20,244
Ctsk	118,997	Serpinb12	20,172
Olfr111	107,974	Kif11	19,892
Emb	93,404	Hnmt	19,729
H2-Ab1	89,518	Cceb1	19,493
Slc24a5	83,944	Olfr110	19,425
Klk1b22	76,560	Zfp125	19,367
Nlrp1c-ps	62,698	Hpgds	19,197
Tnni3k	61,145	Tmem176b	19,125
F7	60,602	Tfec	19,000
Cd84	59,258	Susd1	18,803
Tspan10	51,468	Igf1	18,800
Cd55	39,691	Nrp1	18,730
Cd200r4	37,807	Mreg	18,530
Clec7a	36,834	Ephx1	18,481
Tspan7	35,968	Il12rb2	18,466
Timp2	35,011	Selenop	18,460
Hpse	34,505	St6gal1	18,275
H2-Eb1	34,090	Plxnc1	18,114
Neddd4	33,548	Aoah	18,031
Csf1	32,236	1810011H11Rik	17,936
Orm1	31,974	Tfpi	17,837
Laptm4b	31,840	F10	17,828
Ano3	30,014	Cyfp2	17,458
Pdcd4	29,796	Csf2rb2	17,434
Zfp991	27,962	Gpr65	17,108
Ms4a7	26,848	Rps6ka2	16,950
Ttc23	26,844	Gpnmb	16,666
Tspan32	26,734	Vamp7	16,614
Eya1	26,631	Tagap	16,562
Cd93	25,974	Prrg4	16,200
Wwp1	25,890	Orm3	16,157
Chit1	24,920	Tmem176a	15,805
Slc9a7	24,479	Card11	15,568
Il20rb	23,378	Slamf8	15,548
P2ry14	22,573	Klk1b11	15,255
Itgax	22,471	Bbs7	15,065
Ptgs1	22,222	Antxr1	14,713
Hgf	22,082	Apoc2	14,699
Tmem223	21,264	Large1	14,657
Dapk1	20,862	Fam49a	14,604
Cd33	20,826	Igf2bp3	14,526
Rragd	20,395	Lpar6	14,486
		P2ry1	14,433
		Gstm5	14,134

Resultados

Serpinb6b	14,049
Slc29a3	13,568
Trpm7	13,498
Abcg2	13,417
Fblim1	13,399
Pcmdt1	13,372
Gm14296; 2210418O10Rik	13,371
Sash3	13,356
Mcoln2	13,333
Kif15	13,227
Tceb1	13,126
Frmd4b	12,891
Zfp942	12,888
Ahnak2	12,871
Vps13a	12,592
Ddhd1	12,580
Cpe	12,429
Atg4a	12,377
Zfp971	12,283
LOC101056073	12,208
Dzip3	11,982
C330027C09Rik	11,951
Tnfrsf21	11,945
Zfp931	11,612
Cd86	11,485
Saa3	11,467
Klhl38	11,363
Arl5a	11,296
Edv	11,257
Neo1	11,168
Btg3	11,004
Hltf	10,841
Arhgap19	10,758
Dgat2	10,721
Atm	10,625
Dock3	10,609
Zfp992	10,525
Deptor	10,399
Cd28	10,319
Hnrnpu	10,225
Zfp966	10,138
Nol8	10,129
Zfp280d	10,079
Uchl1	10,073

Tabla V. Genes expresados en la línea celular 3FLAG-LXR β de forma destacada en referencia a la línea celular 3FLAG-LXR α . Los 132 genes identificados por microarrays que experimentan una magnitud de cambio en su expresión mayor o igual a 10 en la línea 3FLAG-LXR β con referencia a la línea celular 3FLAG-LXR α se relacionan en orden según su valor de magnitud de expresión.

TABLA VI.

Símbolo oficial	Magnitud de cambio en expresión		
Il1f9	0,007	Tmem171	0,060
Pcdh7	0,009	Myc	0,061
Slfn4	0,011	Apol9b	0,062
Ly86	0,014	Gpr18	0,062
Ifitm3	0,018	Aqp9	0,063
Cd59a	0,019	Cd72	0,065
Car2	0,020	Socs3	0,065
Stfa3	0,021	Hmga2	0,065
Car5b	0,023	Tm7sf3	0,066
Ltb	0,023	Ccnd2	0,067
Csf3	0,023	Trem1	0,071
Gm5483	0,024	Galnt3	0,073
Lix1	0,026	Il17ra	0,073
Adam8	0,027	As3mt	0,074
Pltp	0,028	Msr1	0,074
Pdgfb	0,028	Lcn2	0,075
Dhcr24	0,032	Pla2g5	0,075
Nxf7	0,033	Olfm1	0,075
Ctse	0,034	Spred3	0,076
Tmem26	0,035	Mt2	0,077
Itgb7	0,035	Lamc1	0,080
P3h2	0,037	Il18rap	0,080
Tmem98	0,037	Ccl4	0,080
Cxcl2	0,038	Ccnd1	0,082
Csprs	0,039	Pdpn	0,082
Nos2	0,040	Irak3	0,082
Ehd2	0,040	Il1rn	0,083
Urah	0,041	A530040E14Rik	0,083
Edn1	0,041	Dusp5	0,083
Cxcl16	0,042	Syn1	0,084
St3gal6	0,042	Sdc4	0,085
Layn	0,043	Fam167b	0,085
Slpi	0,047	Chac1	0,087
Plpp1	0,049	Ighm	0,088
Smagp	0,050	Fgr	0,088
Cda	0,051	Plet1	0,091
Trem3	0,051	Serpine1	0,091
Phlda1	0,051	Atp6v0e2	0,094
Qsox1	0,052	Jdp2	0,094
Ptgs2	0,053	Ccl7	0,095
Gm5416	0,054	Ulbp1	0,097
Capn2	0,055	Gstt1	0,097
Cd80	0,058	Dusp1	0,098
Pla1a	0,059	Fam129a	0,098
Dusp6	0,059	Cpne2	0,099
Zbp1	0,059	Mapk11	0,099
Pdcd1	0,059	Fah	0,099
		Mcomp1	0,100

Tabla VI. Genes expresados en la línea celular 3FLAG-LXR α de forma destacada en referencia a la línea celular 3FLAG-LXR β . Se muestran los 95 genes identificados por microarrays que experimentan una magnitud de cambio en su expresión mayor o igual a 10, en la línea 3FLAG-LXR α en referencia a la línea celular 3FLAG-LXR β . Se relacionan en orden ascendente de magnitud de expresión hasta el valor 0,1 debido a que el análisis del que se deriva es el inverso: expresión en la línea 3FLAG-LXR β con referencia a 3FLAG-LXR α .

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Los receptores LXR α y LXR β son miembros de la familia de receptores nucleares, que juegan un papel crucial en el control del metabolismo del colesterol (Lee y Tontonoz, 2015). Trabajos previos de nuestro grupo de investigación han demostrado que los receptores LXR regulan diversos aspectos transcripcionales de la activación de macrófagos. Si bien ambas proteínas LXR se expresan en estas células del sistema inmunitario, sus funciones individuales en distintos tipos de macrófago tanto *in vivo* como *in vitro* no se han caracterizado en profundidad. Trabajos anteriores, tanto de nuestro grupo como de otros grupos, han determinado de manera global la actividad de LXR, empleando como modelo células o tejidos derivados de los ratones LXR doble *knockout* (denominados aquí LXR DKO) como modelo de estudio. Sin embargo, estudios que hayan centrado sus objetivos en definir la actividad específica de ambos LXR por separado en macrófagos no existen hasta la fecha.

1. Modelo celular de macrófago inmortalizado.

Uno de los grandes objetivos del presente trabajo es abordar el estudio del control transcripcional que presenta cada receptor LXR (LXR α y LXR β) de forma individualizada. Para ello hemos optado por generar un modelo celular que exprese uno u otro receptor acoplado a un polipéptido “FLAG” en un fondo genético deficiente en LXR, para que pueda ser reconocido específicamente por un anticuerpo monoclonal validado. Este abordaje, de manera global, nos ayudará a: 1) disponer de líneas inmortalizadas que expresan uno u otro LXR de manera indefinida, disminuyendo al máximo el sacrificio de ratones *knockout*; 2) disponer de un modelo celular que expresa una versión de LXR α o LXR β acoplada al polipéptido FLAG, que puede ser detectado o inmunoprecipitado específicamente por un anticuerpo validado, y por tanto reduciendo la variabilidad tan grande observada en los anticuerpos comerciales contra LXR α o LXR β ; 3) analizar la expresión génica dependiente de LXR α o LXR β en un modelo celular de expresión forzada, donde los cambios transcripcionales pueden observarse en una magnitud posiblemente superior a las células con expresión fisiológica de LXR.

Así, hemos generado unas líneas inmortalizadas de macrófagos derivados de médula ósea mediante el sistema retrovirus J2, portadores de dos oncogenes murinos: v-myc y v-raf. Inicialmente se generó una línea parental (control) carente de ambos receptores LXR, LXR DKO, a partir de la cual se originarían las otras dos líneas celulares. Empleando el sistema Phoenix, células derivadas de las 293T humanas modificadas para la expresión del gen adenoviral E1a (Frisch y Mymryk, 2002) y un antígeno T sensible a temperatura, se encapsularon los plásmidos de expresión de 3FLAG-LXR α y 3FLAG-LXR β separadamente, en cápsides retrovirales. Estos retrovirus se utilizaron para reconstituir alternativamente la expresión de los receptores LXR en la línea inmortalizada generada LXR DKO, obteniéndose así a partir de ella las otras dos líneas equivalentes y con capacidad para expresar uno de los receptores LXR. Este método de inmortalización, descrito hace años por el laboratorio de Elisabetta Blasi (Blasi et al., 1987), ha demostrado ser un método eficaz y fiable para obtener células de macrófago que se dividen con independencia de la presencia de factor de crecimiento y diferenciación alguno, con las funciones propias de este tipo celular y la expresión de marcadores de macrófago intactas (Blasi et al., 1987) (ver figura 2 del apartado de resultados, página 93).

2. Análisis del perfil transcripcional de LXR α y LXR β mediante microarrays.

Como aproximación transcripcional global para estudiar la actividad de cada una de las proteínas LXR por separado hemos empleado la técnica de análisis de expresión génica por microarrays sobre las tres líneas generadas: 3FLAG-LXR α , 3FLAG-LXR β y LXR DKO control y empleando un agonista y antagonista sintéticos específicos. Con esta estrategia hemos pretendido resaltar los cambios en la expresión de los genes controlados por cada uno de los dos LXR, que estarán sujetos a los efectos de los tratamientos farmacológicos. Adicionalmente, la expresión en condiciones suprafisiológicas de los receptores LXR potencia la magnitud de los cambios transcripcionales. De esta manera se facilita la identificación de posibles nuevos genes diana directos e indirectos de LXR.

Primeramente hemos comprobado la magnitud de los cambios transcripcionales promovidos por los tratamientos farmacológicos en presencia de LXR α o LXR β mediante PCR a tiempo real. De forma general, la inducción de la expresión de varios de los genes clásicos de LXR está promovida de manera análoga tanto por LXR α como por LXR β , si bien ciertas diferencias en la magnitud de su expresión son apreciables (ver figura 7, página 101). Asimismo, para verificar específicamente la correcta funcionalidad del receptor LXR α comprobamos la expresión del gen *Aim* en la línea celular 3FLAG-LXR α y la comparamos con la expresión en las líneas celulares generadas, pudiendo comprobar que de manera mayoritaria, la expresión de *Aim* está controlada por LXR α . Todos estos resultados respaldan que la estrategia de comparar la expresión en las líneas celulares generadas es eficaz y podemos recapitular en este modelo la actividad de ambos receptores por separado, por lo que a continuación decidimos dar un paso e inspeccionar la actividad transcripcional de ambos receptores de manera global.

Hasta la fecha se han identificado más de una veintena de genes diana directos de los receptores LXR en distintos tipos celulares y tejidos (A-González y Castrillo, 2011) (Calkin y Tontonoz, 2012). Si bien nuestra aproximación de estudio detecta, en general, magnitudes de cambio de expresión mayores que en células primarias en los genes ya conocidos, el número absoluto de genes identificados no es desorbitado (ver figuras 8 y 11, páginas 104 y 108) por lo que nos reafirma en que nuestro modelo celular presenta alta especificidad. Algunos genes previamente descritos como dianas de LXR presentan una inducción moderada en su expresión (ver figura 7, página 101), en contraposición con los genes más destacables: *Abca1*, *Abcg1*, *Mylip*, *Scd1*, *Scd2* y *Srebf1*, lo cual puede ser achacable a que el tipo celular donde presentan una expresión más elevada no sea el macrófago y el genoma mantenga una organización no favorable para la expresión de estos genes. Por otro lado, una de las limitaciones de esta técnica es que las magnitudes de cambio en la expresión de los genes pueden verse disminuidas o atenuadas con respecto un ensayo de expresión realizado de forma individualizada por PCR a tiempo real. En nuestro caso, es cierto que se ha observado este fenómeno de desfase previamente al análisis de microarrays con las amplificaciones por PCR a tiempo real que se realizaron para comprobar la integridad y calidad de las muestras de ARN (ver figura 6, página 99). Actualmente el uso de la técnica de microarrays para el estudio de cambios transcripcionales y la identificación de nuevas dianas génicas está altamente validado, por lo que constituye una técnica indicada para el avance en la profundización del estudio de los receptores LXR y el control transcripcional que ejercen cada uno de los receptores.

3. Análisis bioinformático de los resultados obtenidos por microarrays.

3.1. Análisis de la actividad transcripcional de LXR α y LXR β en condiciones activación e inhibición farmacológica.

Dado que ambos receptores LXR comparten un alto grado de homología de secuencia y estudios previos indican que, en general sus funciones pueden ser altamente solapantes (Hong y Tontonoz, 2008), nuestra primera hipótesis está basada en que los grupos de genes controlados transcripcionalmente por cada receptor nuclear pudieran ser muy parecidos. Sin embargo, como ya se ha comentado previamente, existen algunas, aunque muy pocas hasta la fecha, funciones atribuibles únicamente a LXR α (Valledor et al., 2004) (A-Gonzalez et al., 2013). Teniendo en cuenta la expresión diferencial de los receptores LXR en distintos tejidos, es posible pensar que existan otras funciones diferenciales llevadas a cabo por cada uno de los receptores LXR separadamente.

Con el objetivo de profundizar más en el aspecto diferencial de cada receptor LXR, identificamos y analizamos con el programa bioinformático DAVID 6.7 los genes cuya expresión cambia en las líneas celulares, 3FLAG-LXR α y 3FLAG-LXR β , ante los tratamientos farmacológicos, de acuerdo con la activación o bloqueo de la actividad de los receptores LXR. Este programa ofrece una serie de herramientas bioinformáticas basadas en algoritmos para el análisis de listas de genes numerosos, con el fin de identificar las propiedades funcionales y la actividad biológica en las que están implicados. Detectamos que de todas las categorías funcionales en las que se encuadran estos genes, la mitad aproximadamente son funciones biológicas comunes, pero existen otras específicas de cada línea celular. El análisis con el programa R-Studio reveló que los genes cuya expresión varía en presencia de cada receptor nuclear coinciden en un número reducido (ver figura 11, página 108) y como consecuencia, los genes que no se relacionan en esa categoría de “genes comunes”, pueden estar relacionados con procesos funcionales propios de receptor (ver figura 9, página 106).

El análisis bioinformático con DAVID 6.7 reveló que la expresión génica controlada preferentemente por el receptor LXR α está relacionado con funciones como la transcripción en sentido amplio, el control de la expresión de genes que codifican proteínas de unión al ADN a través de dedos de zinc, la señalización a través de receptores acoplados a proteínas G y sus genes diana participan en la ruta secretora del retículo endoplásmico. También cuenta con una función relacionada con la biosíntesis de ácidos carboxílicos, que representa la categoría más numerosa en cuanto a número de genes y que está relacionada con la síntesis de ácidos grasos, la cual es una función de la que ya se conocía su asociación principalmente con este receptor (Zhang et al., 2012). Cada categoría génica asociada específicamente a la línea 3FLAG-LXR α está representada por un número elevado de genes, un promedio entre 8 y 9 genes (ver figura 10A, página 107).

Adicionalmente, realizamos un análisis bioinformático de las cascadas de señalización celulares en las que están implicados los genes con el software Ingenuity Pathway Analysis® (IPA). Este análisis ofrece un punto de vista menos descriptivo, a diferencia del programa DAVID 6.7, y está principalmente diseñado para la clasificación de las moléculas según su implicación en cascadas de señalización y la identificación de las conexiones entre ellas en contextos homeostáticos y patológicos, de acuerdo a las publicaciones científicas en las que se basa el programa. De este modo, obtuvimos un análisis complementario y de mayor profundidad, que nos ofrece una visión más globalizada sobre los procesos biológicos en la célula que pueden estar siendo alterados en respuesta a las condiciones experimentales y su repercusión a nivel sistémico. Pudimos corroborar algunas de las funciones biológicas atribuidas previamente por el programa DAVID 6.7 al receptor LXR α , como su implicación con la señalización a través de receptores de citoquinas o su relación con la biología del linaje celular hematopoyético.

En cuanto al receptor LXR β , el análisis bioinformático realizado con DAVID 6.7 nos conduce a la conclusión de que controla preferentemente la transcripción de genes ligados a procesos metabólicos lipídicos, así como el transporte de lípidos y esteroides. Además, hemos identificado un grupo de funciones específicamente relacionadas con este receptor con una marcada influencia en la respuesta inflamatoria y la producción de citoquinas. Esta novedosa categoría funcional cuenta con hasta 12 genes representativos (ver figura 10B, página 107). Pertenecientes a este grupo se destacan los genes *Il-1 α* , *Lbp* y *Orm-3*. Representan un grupo interesante de genes por las funciones en las que están involucradas, directamente relacionadas con la biología del macrófago y por su regulación, asociada preferentemente a la activación del receptor LXR β .

El análisis bioinformático con el software Ingenuity Pathway Analysis® (IPA) en la línea celular 3FLAG-LXR β resaltó la participación del receptor en varias rutas de señalización relacionadas con la respuesta inmunitaria en macrófagos (señalización por IL-10, IL-12, IL-6, receptores de tipo *toll*) así como la respuesta de fase aguda, función identificada también previamente por el programa DAVID 6.7.

A. Proteína de unión a lipopolisacárido (LBP).

La proteína de unión a lipopolisacárido, LBP ha sido descrita como una glicoproteína que une la fracción del lípido A del lipopolisacárido bacteriano con gran afinidad, formando complejos que facilitan la transferencia a través de la molécula CD14 a su receptor de tipo *toll*, TLR4 (Tobias et al., 1986). El hígado es uno de los principales tejidos productores de esta proteína a nivel sistémico, que es secretada al plasma sanguíneo como proteína de respuesta de fase aguda ante la presencia de lipopolisacárido. La captación del complejo por los macrófagos desencadena la producción de TNF- α y la activación de la respuesta inmunitaria. En este sentido, *Lbp* se ha considerado que tiene propiedades proinflamatorias, pero no son las únicas funciones que se han descubierto para esta molécula (Schumann, 2011).

LBP presenta una gran similitud de secuencia con la proteína de transferencia de ésteres de colesterol, CETP humana (Schumann et al., 1990) y la proteína de transferencia de fosfolípidos, PLTP (Kirschning et al., 1997). Sin embargo, no se ha podido encontrar ninguna implicación de *Lbp* en la homeostasis de lípidos plasmáticos. Se ha atribuido la estructura común con estas proteínas a la función de transporte de moléculas hidrofóbicas o anfipáticas a través de un medio acuoso. Otra serie de estudios han atribuido a *Lbp* propiedades antiinflamatorias, con capacidad de unirse a partículas de LDL y VLDL que potencian la interacción y captación de LPS y su degradación a través de la retirada por receptores *scavenger* (Vreugdenhil et al., 2001). De este modo, se minimizan los efectos biológicos del LPS sobre el organismo. Asimismo, se ha propuesto una función de protección del *Lbp* frente a la sepsis severa, secuestrando el LPS y favoreciendo la resolución de la infección (Zweigner et al., 2001).

Recientemente y coincidiendo en el tiempo con el análisis de LBP como gen diana de LXR desarrollado en esta Tesis Doctoral, se ha descrito otra función sorprendente para la proteína LBP, junto con la demostración de que, efectivamente, se trata de un gen diana regulado directamente por LXR (Sallam et al., 2014). Curiosamente, la expresión de *Lbp* está regulada por LXR de forma tejido-específica, ya que responde a la actividad de LXR en macrófagos, pero no en hígado, sugiriéndose también una función fisiológica de *Lbp* distinta según el tejido. De esta forma, estando exclusivamente bajo el control de LXR β no se esperaría que la expresión de *Lbp* se produzca en el hígado en respuesta a ligandos de este receptor nuclear, ya que la forma más predominantemente expresada en este tejido es LXR α y sin embargo, este tejido es el principal productor de *Lbp*, aunque frente a un evento de infección. En macrófagos se ha comprobado que favorece la supervivencia celular, ya que células derivadas de médula ósea carentes de la expresión génica de *Lbp* sufren mayores tasas de apoptosis debida a la fagocitosis de partículas modificadas de LDL. Por tanto, la ausencia de expresión de la proteína LBP favorece la regresión de las lesiones en los vasos en un contexto proaterogénico (Sallam et al. 2014). A pesar de que estos resultados no están en consonancia directa con las funciones asociadas a los receptores LXR (antiinflamatorias y antiaterogénicas) (Joseph et al., 2002) (Tangirala et al., 2002) es posible que la expresión de LBP dependiente de LXR en macrófagos pueda tener otras connotaciones diferentes en situaciones de infección, en las que la supervivencia celular puede tener unas funciones implicadas en la resolución de la infección. En ese sentido, para esclarecer el papel de LXR en esta señalización, sería necesario e interesante poder realizar experimentos adicionales en los que la actividad de LXR β pudiese ser analizada en macrófagos en presencia o ausencia de expresión de LBP.

Hemos identificado en nuestro sistema celular que la expresión del gen *Lbp* está bajo el control preferencial de LXR β , resultado que está apoyado por los estudios de expresión génica y de inmunoprecipitación de LXR seguido de secuenciación. Constituye un resultado destacable porque no existen reseñas anteriores sobre genes dependientes exclusivamente del receptor LXR β , no siendo así en el caso de LXR α , que tiene enteramente el control transcripcional del gen *Aim* (*Cd5l*) (Valledor et al., 2004) (Joseph et al., 2004). Resulta interesante que los productos de *Aim* y *Lbp* cuenten ambos con propiedades que favorezcan la supervivencia celular en el macrófago, siendo cada uno de los genes regulado por un receptor LXR distinto, por lo que contribuirían a funciones equivalentes en el macrófago, si bien a través de dianas genéticas distintas. Es plausible que aparte de la expresión de *Lbp* resultante de la estimulación de LXR en el macrófago, la producción de *Lbp* hepático en respuesta a una infección actúe de forma paracrina sobre los macrófagos, contribuyendo a estimular su supervivencia ante la presencia de patógenos.

B. Familia de proteínas orosomucoide (ORM).

Los genes de la familia *Orm* o genes de las alfa-1-glicoproteínas ácidas, codifican proteínas de fase aguda pertenecientes a la familia de las lipocalinas, cuya expresión es inducida en el hígado por daño tisular, inflamación o infección en respuesta a los mediadores de tipo glucocorticoide, IL-1 β , IL-6 y TNF- α . Estudios previos demuestran que los receptores de ácidos biliares FXR (receptor X de farnesoide) reprimen la expresión de los genes *Orm* basalmente y activan su transcripción tras la unión de su ligando (Porez et al., 2013). Esta regulación génica depende de la unión directa de FXR en zonas reguladoras en posición 5' de los genes *Orm*, por lo que se cree que es una región clave en el control de la transcripción de todo el grupo de genes *Orm*. Estos datos indican que la expresión de la familia de genes *Orm* puede estar regulada por heterodímeros de RXR, si bien hasta ahora no existen estudios que demuestren regulación dependiente de LXR.

Las funciones en las que participan las alfa-1-glicoproteínas ácidas no se han caracterizado completamente, pero se han descrito funciones inmunomoduladoras y antiinflamatorias (McCurdy et al., 2014) a través del bloqueo de la acción de neutrófilos y el sistema del complemento en ratas (Williams et al., 1997) y la inducción en células mononucleares de sangre periférica de la expresión del inhibidor de IL-1 β , el receptor antagonista de la IL-1 (IL-1Ra) (Tilg et al., 1993). Estas proteínas contienen un alto porcentaje de carbohidratos (hasta un 45%) y de su composición y organización dependen sus propiedades inmunomoduladoras y su capacidad de unión. Se ha demostrado que las proteínas ORM son capaces de unir el LPS (Moore et al., 1997) (Huang et al., 2012) sugiriéndose una función de transporte y/o inmunomoduladora de los efectos derivados del LPS sobre el organismo. En diversos modelos animales de sepsis, se ha comprobado que la administración previa de un extracto de alfa-1-glicoproteínas ácidas o la expresión forzada de estos genes promueve mayor tasa de supervivencia (Moore et al., 1997) (Hochebied et al., 2000).

En vista de las conclusiones obtenidas a través de los ensayos de otros autores, en cuanto a que las alfa-1-glicoproteínas ácidas poseen unas propiedades inmunomoduladoras y amortiguan los efectos del shock séptico, nuestros resultados sobre la regulación transcripcional de *Orm-3* a través del receptor nuclear LXR β se encuentra en consonancia con las funciones biológicas atribuidas a los receptores LXR. Efectivamente, los efectos de la activación de los receptores nucleares LXR está asociado a la expresión de genes con propiedades antiinflamatorias y además estos receptores son capaces por sí mismos de bloquear la transcripción de genes proinflamatorios a través de la transrepresión (Glass y Saijo, 2010). Es necesario destacar, sin embargo, que la expresión de los genes de la familia ORM en macrófagos es reducida en comparación con su expresión hepática. Por tanto, quizá, las consecuencias de los cambios promovidos en la expresión de ORM por LXR β en macrófagos aislados no puedan tener las repercusiones que tiene en un contexto *in vivo*. Resulta también interesante y llamativo que una de las funciones de los genes *Orm* sea la de unión a LPS bacteriano, al igual que el gen *Lbp* el cual ya ha sido comentado. Es destacable por tanto que una de las actividades desempeñadas preferencialmente por LXR β pudiera ser la regulación de procesos infecciosos mediante la inducción de moléculas que promueven la opsonización del LPS bacteriano. Profundizar en el papel de la señalización LXR-ORM en macrófagos en situaciones de inflamación o infección requeriría estudios adicionales empleando estrategias de reducción de la expresión de ORM-3 en macrófagos en presencia o ausencia de LXR β . Estos estudios se encuentran actualmente en fase de realización.

C. Interleuquina-1 α (Il-1 α).

La interleuquina-1 α (Il-1 α), al igual que la interleuquina-1 β (Il-1 β), es una citoquina que induce potentemente el proceso inflamatorio, pero su biogénesis y características específicas han sido menos estudiadas que las de la Il-1 β . Las principales diferencias estriban en su generación y biodisponibilidad: así como la maduración de la Il-1 β requiere de la actividad de la proteasa caspasa-1 tras lo cual será secretada, la Il-1 α es activa tanto previamente a la escisión (pro-Il-1 α) como después de ser escindida y puede actuar como citoquina secretada o unida a la membrana por una unión de tipo lectina (Kurt-Jones et al. 1985) (Brody y Durum, 1989). Una importante diferencia entre Il-1 α e Il-1 β es que esta última no se produce en condiciones homeostáticas y sólo se libera por parte de células hematopoyéticas al activarse, sin embargo, la Il-1 α está presente bajo ambas condiciones y puede liberarse por todo tipo de células (Bersudsky et al., 2014). Los estímulos que pueden desencadenar la inducción de Il-1 α en monocitos son de tipo proinflamatorio o asociados a estrés como el ambiente oxidativo, sobrecarga de lípidos, estímulos de tipo hormonal, exposición a otras citoquinas y mediadores inflamatorios (Di Paolo y Shayakhmetov, 2016). Se han encontrado sitios de unión de NF κ B y AP-1 en la región promotora de *Il-1 α* que mediarían esta expresión inducible (Mori y Prager, 1996) y sitios de unión del factor de transcripción Sp1, que regula la expresión de genes constitutivos en homeostasis. Se ha observado que en macrófagos la Il-1 α completa (pro-Il-1 α) se dirige al núcleo tras la estimulación con LPS, lo cual no ocurre en otros tipos celulares como queratinocitos o fibroblastos, en los que la pro-Il-1 α se encuentra constitutivamente en el núcleo. Una vez allí es capaz de interactuar con complejos activadores de la transcripción como las acetiltransferasas

p300, GCN5 y PCAF y activar la transcripción de genes proinflamatorios. La importancia de IL-1 α en la señalización inflamatoria reside en que mientras que la caspasa-1, de la que depende la escisión de pro-IL-1 β para convertirse en una molécula activa, puede ser bloqueada por los factores de virulencia de algunos patógenos, la IL-1 α puede seguir induciendo la respuesta inflamatoria en su forma anclada a la membrana (Di Paolo y Shayakhmetov, 2016).

Un estudio realizado con el modelo de ratón de aterosclerosis (*Ldlr* KO) carente además de la expresión de IL-1 α o IL-1 β reveló que la IL-1 α producida por células mieloides es importante para el desarrollo de la enfermedad (Freigang et al., 2013). Esta acción de carácter proinflamatorio desempeñada por la IL-1 α está inducida por ácidos grasos producidos en ambiente inflamatorio y estarían mediadas por los receptores NF κ B y AP-1. Como ya se ha señalado, la IL-1 α participa también en las funciones homeostáticas de la célula, las cuales sin embargo, no están bien definidas.

En nuestro sistema celular hemos demostrado que la expresión de *Il-1 α* aumenta en respuesta al agonista GW3965, preferentemente asociado a la función del receptor LXR β , por tanto, en condiciones de ausencia de inflamación inducida por agentes exógenos. Es por tanto sorprendente que, a pesar del papel antiinflamatorio descrito previamente para los agonistas específicos de LXR, en nuestro sistema celular hayamos encontrado una inducción de la expresión de varios genes relacionados con la activación de la respuesta inflamatoria, respuesta de fase aguda y antimicrobiana. Es importante resaltar como posible explicación a esta discrepancia, que la mayoría de los estudios previos de LXR relacionados con la inflamación emplearon estrategias de estimulación previa con agonistas específicos antes de la activación inflamatoria (generalmente con LPS o TNF α), por lo que los mecanismos de transrepresión dependiente de ligando (Glass y Saijo, 2010) pueden ejercer sus efectos de forma anticipada.

En contraposición a la observación realizada por Freigang sobre la función de la IL-1 α en el modelo murino de aterosclerosis, se ha descrito un importante papel de la ruta de activación de la IL-1 α y su receptor IL-1R1, en la respuesta inflamatoria producida por macrófagos de la zona marginal del bazo, en respuesta a la infección por adenovirus (Di Paolo et al., 2009) (Di Paolo et al., 2014). La activación de la vía de señalización de la IL-1 α produce la liberación de las quimioquinas CXCL1 y CXCL2, que con la colaboración del sistema del complemento, atraen a leucocitos polimorfonucleares a la zona marginal del bazo, donde los macrófagos neutralizan los virus invasores. Este mecanismo se produce con independencia de la activación del receptor de tipo *toll* 9 (TLR9) y el inflamasoma NLRP3. Por tanto, la producción de IL-1 α por los macrófagos esplénicos es fundamental para la respuesta antivírica, a través de la atracción de leucocitos desde la médula ósea y posterior eliminación de las células portadoras de virus (Di Paolo et al., 2014).

De manera similar a lo comentado previamente para las proteínas ORM, la expresión de IL-1 α inducida por el agonista de LXR es muy reducida en comparación con la magnitud de expresión de IL-1 α en respuesta a un estímulo inflamatorio. Para esclarecer el papel de IL-1 α dependiente de LXR β en situaciones inflamatorias agudas, experimentos adicionales empleando células aisladas de ratones WT, LXR α KO y LXR β KO con tratamientos inflamatorios y agonistas de LXR en distintos momentos (previo, coincidente y posterior al insulto inflamatorio) son necesarios y están actualmente en proceso de realización, pero no han podido incluirse en la memoria de esta Tesis Doctoral.

3.2. Análisis de la actividad transcripcional en referencia a la línea celular LXR DKO.

El análisis de expresión génica de cada línea celular (3FLAG-LXR α o 3FLAG-LXR β) utilizando como referencia la transcripción en la línea LXR DKO revela un punto de vista distinto, pudiéndose observar cambios en la expresión génica de genes diana potenciada por la mera expresión de receptores LXR en la célula. El número de genes que se destacan de esta manera difiere mucho según se trate de la línea 3FLAG-LXR α o 3FLAG-LXR β , siendo el primer grupo más numeroso (1.114 genes) que el segundo grupo (123 genes).

Una explicación plausible para este fenómeno es que como consecuencia de la expresión suprafisiológica de los receptores LXR y su activación posterior, podría existir una regulación de la transcripción génica de forma incontrolada y no fisiológica, debido a la presión a nivel molecular de una gran presencia de los receptores activos frente a una referencia en ausencia total de LXR. Ello puede conllevar la unión de las proteínas LXR a secuencias en el ADN no canónicas o con mayor flexibilidad de secuencia, así como promover la accesibilidad a regiones de cromatina que se encuentren compactas inicialmente. Estas posibles explicaciones requieren de un análisis más exhaustivo de las regiones de unión de cada uno de los LXR en el genoma, mediante herramientas bioinformáticas que actualmente estamos implementando en el laboratorio. Por ejemplo, analizando si existen secuencias comunes o distintas presentes en los potenciales sitios de unión a los que se une tanto LXR α como LXR β .

Como resultado del análisis funcional de los genes que destacan en la línea 3FLAG-LXR α frente a la línea LXR DKO con DAVID 6.7, hemos encontrado que cuentan con una amplia variedad de funciones, entre las que también se incluyen casi todas las identificadas previamente en el análisis con los tratamientos farmacológicos, sin embargo, los genes que componen estos dos grupos de análisis es diferente en casi su totalidad. En resumen, se destaca que LXR α controla ciertas funciones biológicas de forma preferente, que incluyen la unión de iones metálicos, participación en la ruta secretora del retículo endoplásmico y la transcripción. La identificación de la categoría funcional de "Transcripción" y dado el gran número de genes que se destacan del análisis con respecto a la línea LXR DKO, indica que LXR α podría estar induciendo la expresión de otros factores de transcripción, por lo que esta categoría contaría con productos directos e indirectos de la actividad transcripcional de LXR α .

Otra posible hipótesis que puede explicar la actividad transcripcional de la línea 3FLAG-LXR α frente a la línea LXR DKO y el elevado número de genes relevantes de dicho análisis (63 genes al alza con los tratamientos farmacológicos dentro la propia línea 3FLAG-LXR α y 1.114 genes con respecto a la línea LXR DKO), podemos referirnos a un fenómeno que ya ha sido descrito con anterioridad (Guan et al., 2005). Consiste en la regulación de la expresión de determinados genes que requeriría de la presencia de los receptores LXR, aunque no experimenten cambios significativos en su expresión cuando son sometidos a los tratamientos con el agonista y el antagonista sintéticos. Se sugiere que podría estar produciéndose una colaboración entre el receptor LXR α y otros factores que en conjunto posibiliten la transcripción de algunos genes. Fue descrito inicialmente para el receptor nuclear PPAR γ y los genes diana *Fabp4* (proteína de unión

de ácidos grasos, *fatty acid binding protein*, también llamada aP2) y GyK (glicerol quinasa) en tejido adiposo (Guan et al., 2005). En este caso, la expresión de *Fabp4* presenta una actividad basal elevada que se perpetúa independientemente de ligando y por tanto, no es sensible a la activación del receptor nuclear PPAR γ (Guan et al., 2005). En este sentido, se ha descrito con anterioridad que el receptor LXR α puede asociarse con el coactivador SRC-1 de forma ligando independiente (Zhai et al., 2010), pero este aspecto de la actividad del receptor nuclear ha sido poco explorado hasta la fecha.

Este mecanismo de activación también ha sido identificado y caracterizado con cierto detalle en nuestro laboratorio, en el contexto de la diferenciación de células dendríticas derivadas de monocitos de ratón con la citoquina GM-CSF (datos no publicados). En el estudio que se llevó a cabo en estas células se encontró que el gen de la lectina *CD209a* se expresa de forma dependiente de GM-CSF y LXR α , pero independientemente de la activación del receptor nuclear. Corroboramos de forma indirecta este mecanismo de activación a través de la medida de los niveles de expresión basal por qPCR y tras la exposición de las células al antagonista específico de LXR GW233, lo que reveló que efectivamente el tratamiento con GW233 consigue disminuir el nivel de expresión basal de *CD209a*. Ya que el nivel basal de este gen se encuentra elevado y no es posible inducir más su transcripción con el agonista de LXR, se optó por la estrategia contraria: el uso del antagonista bloquea la interacción del receptor con proteínas coactivadoras y permite detectar una disminución en los niveles de expresión del gen basalmente.

Este mecanismo molecular podría ser una de las razones por las que en el análisis de la actividad transcripcional de LXR α frente a la línea LXR DKO abarque casi 18 veces más genes, en comparación con el conjunto de genes que responderían a los tratamientos farmacológicos en la línea celular 3FLAG-LXR α (ver figura 17A, página 122). Es posible que estableciendo un valor de magnitud de expresión significativo menos restrictivo que el que se ha utilizado en estos análisis (valor inferior a 2) el solapamiento que se identificaría entre los dos grupos de análisis fuera mayor.

Estos genes que tienen una expresión más destacada en la línea celular 3FLAG-LXR α con respecto a la línea LXR DKO tienen además una expresión preferente en la línea 3FLAG-LXR α con respecto a la línea 3FLAG-LXR β , lo que indicaría que son genes cuya transcripción dependería marcadamente de la actividad de LXR α , pero no de LXR β . De hecho, estos grupos de genes que se obtienen de los dos análisis de comparación son en su mayoría coincidentes (ver figura 17A, página 122).

Estas observaciones además pueden darnos una idea sobre la organización genómica de las líneas celulares generadas expresando sólo uno de los receptores LXR: las funciones biológicas que controlan estarían relacionados con la accesibilidad a las regiones genómicas reguladoras de la transcripción, en los genes que desempeñan estas funciones.

En cambio, en el análisis de LXR β frente a LXR DKO el aumento en número de genes que se identifica al referenciar la transcripción frente al genotipo control LXR DKO es menor que la que se registraba en la línea 3FLAG-LXR α (ver figura 17B, página 122). El número de genes comunes

al análisis con los tratamientos farmacológicos guarda mayor correlación que la observada para el receptor LXR α : aproximadamente la mitad de los genes son comunes a ambos análisis, lo cual como ya se ha comentado anteriormente, estaría relacionado con el valor de magnitud de cambio en la expresión que se establezca como significativo, que resaltaría sólo los genes que cuentan con un nivel de expresión relevante para el análisis.

Se observa que en la línea 3FLAG-LXR β se destacan transcripcionalmente un mayor número de genes, 2.237 genes, en comparación con la expresión con la que cuentan en la línea 3FLAG-LXR α (ver figura 17B, página 122). Se podría deducir que el conjunto de genes que se expresa preferentemente en la línea 3FLAG-LXR β es dependiente para su expresión de la actividad del receptor LXR β , sin embargo, se observa que, a diferencia de lo que ocurriría con la línea 3FLAG-LXR α , este grupo de genes no es apenas coincidente con el grupo de genes de expresión destacada en la línea 3FLAG-LXR β con referencia a la línea control LXR DKO.

Integrando esta la información en el contexto biológico, es plausible que el receptor LXR α actúe como un represor de la expresión de estos genes y que LXR β cuente con un papel menor en su expresión, por lo tanto, los niveles transcripcionales de estos genes en la línea 3FLAG-LXR β serán iguales a los que se podrían encontrar en un genotipo control LXR DKO y es la razón de que no destaquen en un análisis comparativo con el genotipo control ni se regule su expresión significativamente con los tratamientos farmacológicos. Por ello, al hacer una comparativa con la línea celular 3FLAG-LXR α , la expresión en la línea 3FLAG-LXR β destaca con respecto a 3FLAG-LXR α porque LXR α está ejerciendo una acción represiva sobre la transcripción de estos genes. Para confirmar esta hipótesis se realizó un análisis del grado de coincidencia entre los genes que presentan una expresión más elevada en el genotipo control LXR DKO en relación a la línea 3FLAG-LXR α (datos de expresión obtenidos del grupo de análisis número 4, expresión en la línea 3FLAG-LXR α comparado con LXR DKO) y que al mismo tiempo destacan en la línea 3FLAG-LXR β con respecto a la línea 3FLAG-LXR α . El análisis con el programa R-Studio reveló que más del 80% de los genes eran comunes a ambas condiciones, por lo tanto, podemos afirmar que LXR α ejerce una actividad represora de la transcripción de un grupo importante de genes, que sin embargo, son expresados en ausencia de dicho receptor, es decir, en el genotipo control LXR DKO y cuando sólo el receptor LXR β , pero no LXR α , está expresado.

3.3. Análisis de la actividad transcripcional preferente en la línea 3FLAG-LXR α en referencia a 3FLAG-LXR β y viceversa.

El análisis de la actividad transcripcional preferente en la línea 3FLAG-LXR β sobre la actividad en la línea celular 3FLAG-LXR α ha revelado que existe claramente un mayor número de transcritos controlados transcripcionalmente por LXR β en comparación con LXR α (2.237, en comparación con 1.033 controlados por LXR α). Si examinamos la expresión tisular de los receptores LXR cobra sentido el hecho de que sea LXR β el receptor que regula mayor número de transcritos, ya que LXR α tiene una distribución marcadamente tejido-específica, ligados a funciones principalmente metabólicas, mientras que LXR β se expresa de manera mucho más amplia en todos los tejidos (Repa y Mangelsdorf, 2000). Teniendo en cuenta el origen y la evolución propuesta para estos receptores (Fonseca et al., 2017) sería plausible afirmar que en un principio se originaron los receptores LXR como consecuencia de una duplicación génica y ambos desempeñaran las mismas funciones, pero luego podrían haberse especializado, en concreto el receptor LXR α , en un conjunto de funciones, quedando LXR β al cargo de las funciones biológicas originales.

La distribución de los genes según su magnitud de cambio es muy dispar en el grupo de análisis de la línea 3FLAG-LXR β en relación a 3FLAG-LXR α , estando el 71,6% distribuido entre la magnitud de cambio en expresión entre 2 y 3 veces. Los genes que destacamos en el primer análisis con los tratamientos farmacológicos: *Lbp*, *Il-1 α* y *Orm-3* se encuentran entre los que tienen una magnitud de expresión más potente en este análisis: *Il-1 α* tiene un ratio de 6,5, *Lbp* 8,1 y *Orm-3* tiene un ratio de 16. También se encuentran entre los genes que se expresan significativamente en la línea 3FLAG-LXR β con respecto al genotipo LXR DKO y con respecto a la línea 3FLAG-LXR α .

En conclusión, con estos análisis podemos destacar que la regulación ejercida por cada uno de los receptores nucleares LXR α y LXR β sobre un mismo conjunto de genes es diferente y cada uno tiene un perfil transcripcional propio y característico. Además, los avances realizados en la comprensión de la regulación génica y la organización genómica, en los que hemos contribuido con este trabajo, nos permiten señalar que la regulación transcripcional, en concreto de estos receptores nucleares, no se trata de un concepto lineal basado en la activación del receptor y consecuentemente de la transcripción génica, sino que posee una mayor profundidad y complejidad. Se ha podido poner de manifiesto con la observación de que algunos genes no dependen enteramente de la activación del receptor LXR con un agonista específico, sino de su presencia, pudiendo atraer coactivadores de forma ligando independiente. También en el hecho de que siendo LXR α y LXR β dos receptores muy parecidos estructuralmente, existen conjuntos de transcritos regulados sólo por una de estas proteínas, lo cual conlleva una coordinación entre ellas en el contexto de los tejidos que expresan ambos receptores LXR.

4. Optimización de la técnica de inmunoprecipitación de cromatina dependiente de LXR en macrófagos.

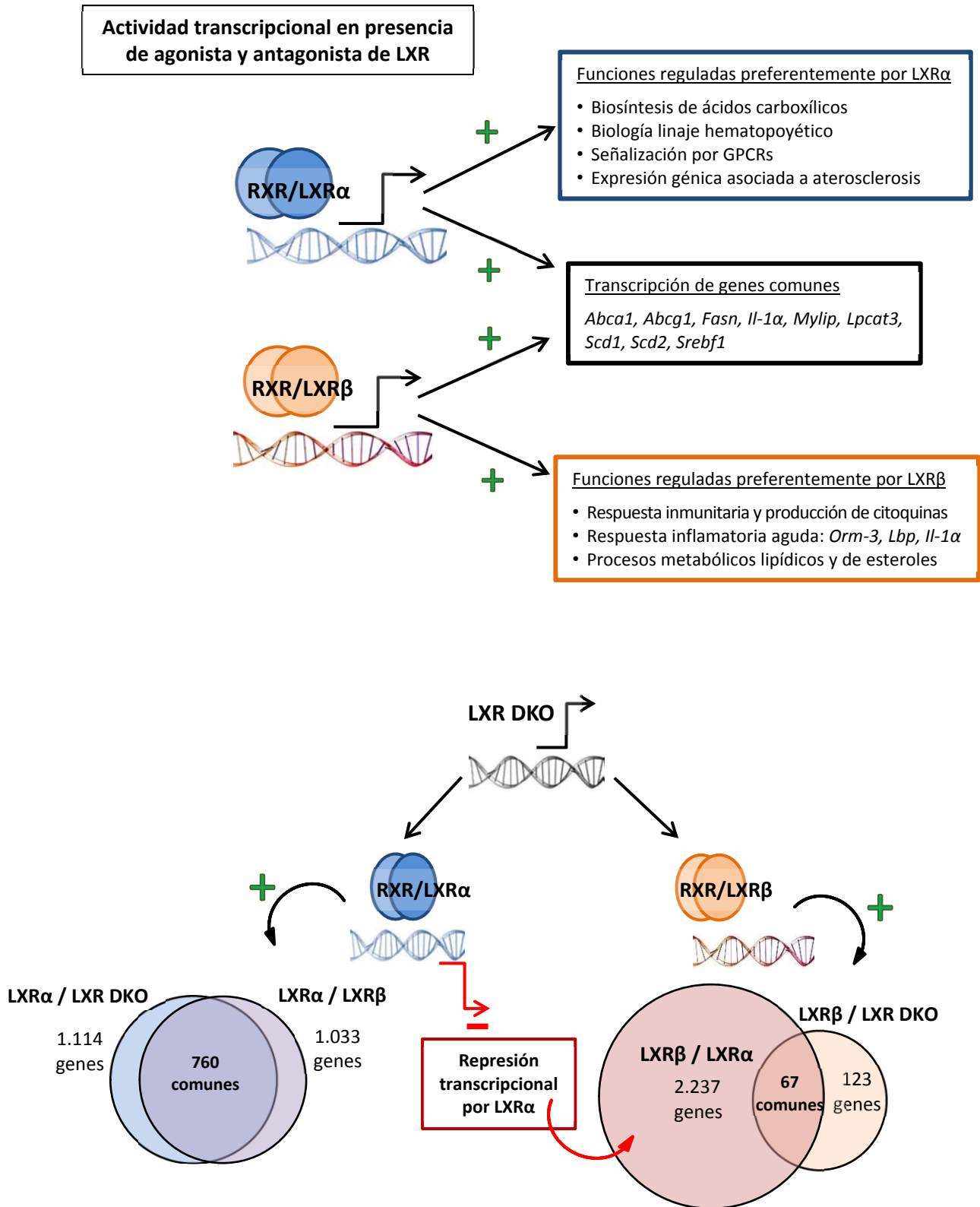
Por otra parte, la optimización de la técnica de CHIP de LXR que hemos llevado a cabo para su aplicación tanto en células primarias de macrófago como en las líneas inmortalizadas generadas, nos ha permitido avanzar en el conocimiento de la regulación y distribución diferencial de los receptores LXR α y LXR β en el genoma. Hemos identificado la extensión de las marcas de acetilación en la lisina 27 de la histona H3 en cada una de las líneas celulares tras el tratamiento con el agonista y antagonistas sintéticos de LXR. Estas marcas nos indican las regiones de cromatina no compactada y accesible para la maquinaria de transcripción, lo que nos informa indirectamente de la actividad transcripcional de los genes cercanos.

Hemos estudiado estas modificaciones de las histonas y la unión de los receptores LXR en las proximidades de los genes identificados anteriormente como transcritos exclusivamente por LXR β , así como en el gen *Il-1 α* , regulado tanto por la activación de LXR α como de LXR β . Comprobamos que *Lbp*, la familia de genes *Orm* (pero más particularmente *Orm-3*) e *Il-1 α* cuentan únicamente con unión de este receptor y las modificaciones de acetilación son sensibles a los tratamientos farmacológicos sólo en la línea 3FLAG-LXR β . Por ello, indicamos que estos tres genes cuentan con una unión preferente del receptor LXR β sobre LXR α y que su regulación transcripcional es a través de este receptor también, salvo en el caso de *Il-1 α* cuya expresión se detecta en la línea 3FAG-LXR α también, aunque la magnitud de unión de este receptor es menor que en el caso del receptor LXR β . El control logrado sobre esta técnica para su aplicación en el material genético de macrófagos nos ha posibilitado obtener una visión más precisa de la reorganización del genoma ante diferentes estímulos, lo cual puede aplicarse para estudios futuros en este campo.

5. Deleción de secuencias de unión de LXR en el genoma de macrófagos con CRISPR.

Finalmente, hemos aplicado con éxito la técnica de edición genómica de CRISPR para deleccionar la secuencia consenso de unión de LXR en el sitio regulador de la transcripción del gen diana *Myliip* y hemos logrado que la regulación de su transcripción por el receptor LXR se anule prácticamente por completo. Hemos comprobado por PCR cuantitativa a tiempo real que la expresión de este gen no responde ni al tratamiento con el ligando sintético de LXR ni a la combinación de tratamientos con el ligando de RXR. Mediante análisis por western blot hemos comprobado que la proteína diana sobre la que actúa MYLIP (LDLR, receptor de LDL) causando su degradación, no se ve afectada tras la deleción, teniendo por tanto una consecuencia celular indirecta importante.

Con estos experimentos alentadores se abren otras posibilidades para el estudio de la regulación y organización del genoma, como ya se han abordado en otros proyectos (Thomas et al., 2016) con la deleción de *enhancers* o por ejemplo, dilucidar si existe una jerarquía entre los sitios de unión de LXR en los genes que se regulan a través de varias secuencias de unión, o identificar los genes a los que afectan sitios de unión lejanos o dudosos.



Esquema que resume los aspectos más relevantes del perfil transcripcional propio de los receptores nucleares LXRα y LXRβ en macrófagos murinos, estudiado en la presente Tesis Doctoral.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- La generación de líneas inmortalizadas de macrófagos que expresan de manera estable los receptores nucleares LXR α y LXR β por separado, ha aportado una herramienta esencial en este trabajo para el estudio de su actividad transcripcional individual.
- Los receptores nucleares LXR α y LXR β , a pesar de su elevado grado de homología de secuencia, presentan, sorprendentemente, un patrón de actividad transcripcional diferencial, compartiendo el control de la expresión génica de una fracción proporcionalmente pequeña de genes.
- El porcentaje de genes cuya expresión de ARN presenta cambios en respuesta a la modulación farmacológica por un agonista y un antagonista de LXR, es comparable entre la línea celular que expresa LXR α y LXR β . Es decir, la actividad transcripcional dependiente de ligando es similar entre LXR α y LXR β .
- Si bien la aproximación de activación farmacológica en nuestro sistema celular ha desvelado un número limitado de nuevas dianas moleculares de LXR, los cambios observados en expresión génica (tanto en número de genes como en magnitud diferencial con la línea LXR DKO) por la propia expresión estable de LXR α y LXR β , han sido muy acusados y es donde se observan más diferencias entre LXR α y LXR β .
- Empleando la expresión génica global del macrófago en ausencia total de LXR como control de análisis, observamos que el receptor nuclear LXR α presenta una actividad transcripcional dual. Por un lado, la expresión estable de LXR α , pero no LXR β , es capaz de aumentar los niveles de ARN de un grupo de genes cuya actividad biológica está relacionada con procesos celulares como la funcionalidad del retículo endoplásmico o la señalización de receptores de membrana. Por otro, LXR α presenta una acción transcripcional represora, sobre un grupo numeroso de genes que desempeñan funciones muy variadas, entre las que se encuentran algunas relacionadas con la respuesta inflamatoria y la funcionalidad de las células T. El receptor LXR β también es capaz de ejercer una acción represora sobre la transcripción de un grupo de genes, pero mucho menos numeroso que en el caso de LXR α .
- La expresión estable de LXR β en el macrófago participa en el control transcripcional preferencial de un grupo de genes relevantes por su implicación en diferentes aspectos de la respuesta inflamatoria, como *Il-1 α* , *Lbp* y *Orm-3*.

Conclusiones

- La eliminación selectiva de pequeñas regiones genómicas mediante nuevas técnicas de edición genómica (CRISPR) ha revelado su enorme potencial como herramienta experimental para demostrar la importancia de regiones reguladoras en las que participa LXR transcripcionalmente.
- La técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) seguida de secuenciación masiva, optimizada para su aplicación en el estudio del genoma de macrófagos murinos, ha demostrado ser una técnica precisa y fiable para la determinación de las regiones de unión genómicas (cistroma) de los receptores LXR α y LXR β , así como para la localización de las marcas de acetilación en la lisina 27 de la histona H3 (H3K27Ac), asociadas con la transcripción activa.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

- The immortalized macrophage cell lines that we generated, with stable expression of LXR α and LXR β nuclear receptors, represent an essential tool to enable the study of individual LXR transcriptional activities.
- Despite the high sequence homology between LXR α and LXR β nuclear receptors, strikingly enough, present a different transcriptional pattern and they share the control of a proportionally reduced fraction of genes
- The percentage of genes which present changes in their RNA expression, upon pharmacological modulation with the LXR agonist and antagonist, is comparable among the cellular lines which express LXR α or LXR β . In other words, ligand-dependent transcriptional activity is similar between LXR α and LXR β .
- Even though the pharmacological activation approach in our cellular system has unveiled a limited number of new LXR target genes, changes concerning gene expression (both number of genes and fold change in reference to the LXR DKO cell line) derived from the stable expression of LXR α and LXR β , have been very marked. Here is where we observe more differences between the LXR α and LXR β receptors.
- Taking macrophage gene expression globally in total absence of LXR expression as control of analysis, we identify a dual transcriptional activity performed by LXR α . On the one hand, stable expression of LXR α , but not LXR β , leads to an increase in the RNA levels of a group of genes functionally related to cellular processes like endoplasmic reticulum functionality and cell signalling through membrane receptors. On the other hand, LXR α presents a transcriptional repressive role on a number of genes with a variety of functions, among them, the inflammatory response and T cell functionality. LXR β nuclear receptor is also able to exert a transcriptional repressive role on a set of genes not as large as in the case for LXR α .
- Stable expression of LXR β in macrophages takes part preferentially in the transcriptional control of a set of relevant genes for their implication in different aspects of inflammatory response, exemplified by *Il-1 α* , *Lbp* and *Orm-3*.

Conclusions

- Selective elimination of short regions using new genomic editing techniques (CRISPR) has revealed to exhibit a great potential as an experimental tool to demonstrate the relevance of this regulatory regions under LXR transcriptional control.
- The chromatin immunoprecipitation technique combined with next-generation sequencing (ChIP-seq), optimized for the study of the mouse macrophage genome, has emerged as a precise and accurate technique to determine the genomic binding sites (cistrome) of the LXR α and LXR β nuclear receptors. Likewise, ChIP-seq can contribute to determine the localization of the acetylation marks on the lysine 27 of the histone H3 (H3K27Ac), associated with active transcription.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- A-Gonzalez, Noelia, Steven J Bensinger, Cynthia Hong, Susana Beceiro, Michelle N Bradley, Noam Zelcer, Jose Deniz, et al. 2009. "Apoptotic Cells Promote Their Own Clearance and Immune Tolerance through Activation of the Nuclear Receptor LXR." *Immunity* 31 (2): 245–58.
- A-González, Noelia, and Antonio Castrillo. 2011. "Liver X Receptors as Regulators of Macrophage Inflammatory and Metabolic Pathways." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1812 (8): 982–94.
- A-Gonzalez, Noelia, Jose a Guillen, Germán Gallardo, Mercedes Diaz, Juan V de la Rosa, Irene H Hernandez, Maria Casanova-Acebes, et al. 2013. "The Nuclear Receptor LXR α Controls the Functional Specialization of Splenic Macrophages." *Nature Immunology* 14 (8): 831–39.
- Apfel, R, D Benbrook, E Lernhardt, M A Ortiz, G Salbert, and M Pfahl. 1994. "A Novel Orphan Receptor Specific for a Subset of Thyroid Hormone-Responsive Elements and Its Interaction with the Retinoid/thyroid Hormone Receptor Subfamily." *Molecular and Cellular Biology* 14 (10): 7025–35.
- Barrangou, R., C. Fremaux, H. Deveau, Melissa Richards, Patrick Boyaval, Sylvain Moineau, Dennis A Romero, and Philippe Horvath. 2007. "CRISPR Provides Acquired Resistance against Viruses in Prokaryotes." *Science (New York, N.Y.)* 315 (5819): 1709–12.
- Barski, Artem, Suresh Cuddapah, Kairong Cui, Tae-Young Roh, Dustin E. Schones, Zhibin Wang, Gang Wei, Iouri Chepelev, and Keji Zhao. 2007. "High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome." *Cell* 129 (4): 823–37.
- Bensinger, S. J., M. N. Bradley, Sean B Joseph, Noam Zelcer, Edith M Janssen, Mary Ann Hausner, Roger Shih, et al. 2008. "LXR Signaling Couples Sterol Metabolism to Proliferation in the Acquired Immune Response." *Cell* 134 (1): 97–111.
- Bersudsky, Marina, Lotem Luski, Daniel Fishman, Rosalyn M White, Nadya Ziv-Sokolovskaya, Shahar Dotan, Peleg Rider, et al. 2014. "Non-Redundant Properties of IL-1 α and IL-1 β during Acute Colon Inflammation in Mice." *Gut* 63 (4): 598–609.
- Bischoff, Eric D, Chris L Daige, Mary Petrowski, Harry Dedman, Jennifer Pattison, Joseph Juliano, Andrew C Li, and Ira G Schulman. 2010. "Non-Redundant Roles for LXR α and LXR β in Atherosclerosis Susceptibility in Low Density Lipoprotein Receptor Knockout Mice." *Journal of Lipid Research* 51 (5): 900–906.
- Blasi, E, B J Mathieson, L Varesio, J L Cleveland, P a Borchert, and U R Rapp. 1985. "Selective immortalization of Murine Macrophages from Fresh Bone Marrow by a Raf/myc Recombinant Murine Retrovirus." *Nature* 318 (6047): 667–70.
- Blasi, Elisabetta, Danuta Radzioch, Scott K. Durum, and Luigi Varesio. 1987. "A Murine Macrophage Cell Line, immortalized by v-Raf and v-Myc Oncogenes, Exhibits Normal Macrophage Functions." *European Journal of Immunology* 17 (10): 1491–98.
- Boergesen, M, T Å Pedersen, B Gross, S J van Heeringen, D Hagenbeek, C Bindesbøll, S Caron, et al. 2012. "Genome-Wide Profiling of Liver X Receptor, Retinoid X Receptor, and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α in Mouse Liver Reveals Extensive Sharing of Binding Sites." *Molecular and Cellular Biology* 32 (4): 852–67.

Bibliografía

- Bradley, Michelle N, Cynthia Hong, Mingyi Chen, Sean B Joseph, Damien C Wilpitz, Xuping Wang, Aldons J Lusis, et al. 2007. "Ligand Activation of LXR Beta Reverses Atherosclerosis and Cellular Cholesterol Overload in Mice Lacking LXR Alpha and apoE." *The Journal of Clinical Investigation* 117 (8): 2337–46.
- Brody, D T, and S K Durum. 1989. "Membrane IL-1: IL-1 Alpha Precursor Binds to the Plasma Membrane via a Lectin-like Interaction." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 143 (4): 1183–87.
- Calkin, Anna C., and Peter Tontonoz. 2012. "Transcriptional Integration of Metabolism by the Nuclear Sterol-Activated Receptors LXR and FXR." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13 (4): 213–24.
- Cao, R., L. Wang, H. Wang, L. Xia, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, R. S. Jones, and Y. Zhang. 2002. "Role of Histone H3 Lysine 27 Methylation in Polycomb-Group Silencing." *Science* 298 (5595): 1039–43.
- Castrillo, Antonio, Sean B Joseph, Chaitra Marathe, David J Mangelsdorf, and Peter Tontonoz. 2003a. "Liver X Receptor-Dependent Repression of Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Macrophages." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (12): 10443–49.
- Castrillo, Antonio, Sean B Joseph, Sagar A Vaidya, Margaret Haberland, Alan M Fogelman, Genhong Cheng, and Peter Tontonoz. 2003b. "Crosstalk between LXR and Toll-like Receptor Signaling Mediates Bacterial and Viral Antagonism of Cholesterol Metabolism." *Molecular Cell* 12 (4): 805–16.
- Chen, Baohui, Luke A Gilbert, Beth A Cimini, Joerg Schnitzbauer, Wei Zhang, Gene-Wei Li, Jason Park, et al. 2013. "Dynamic Imaging of Genomic Loci in Living Human Cells by an Optimized CRISPR/Cas System." *Cell* 155 (7): 1479–91.
- Cong, Le, F Ann Ran, David Cox, Shuailiang Lin, Robert Barretto, Naomi Habib, Patrick D Hsu, et al. 2013. "Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems." *Science (New York, N.Y.)* 339 (6121): 819–23.
- Daniel, B., G. Nagy, N. Hah, A. Horvath, Z. Czimmerer, S. Poliska, T. Gyuris, et al. 2014. "The Active Enhancer Network Operated by Liganded RXR Supports Angiogenic Activity in Macrophages." *Genes & Development* 28 (14): 1562–77.
- Davies, Luke C, Stephen J Jenkins, Judith E Allen, and Philip R Taylor. 2013. "Tissue-Resident Macrophages." *Nature Immunology* 14 (10): 986–95.
- Di Paolo, Nelson C., Lisa K. Baldwin, Eric E. Irons, Thalia Papayannopoulou, Stephen Tomlinson, and Dmitry M. Shayakhmetov. 2014. "IL-1 α and Complement Cooperate in Triggering Local Neutrophilic Inflammation in Response to Adenovirus and Eliminating Virus-Containing Cells." Edited by Michael J. Imperiale. *PLoS Pathogens* 10 (3): e1004035.
- Di Paolo, Nelson C, Edward A Miao, Yoichiro Iwakura, Kaja Murali-Krishna, Alan Aderem, Richard A Flavell, Thalia Papayannopoulou, and Dmitry M Shayakhmetov. 2009. "Virus Binding to a Plasma Membrane Receptor Triggers Interleukin-1 Alpha-Mediated Proinflammatory Macrophage Response in Vivo." *Immunity* 31 (1): 110–21.

Bibliografía

- Di Paolo, Nelson C, and Dmitry M Shayakhmetov. 2016. "Interleukin 1 α and the Inflammatory Process." *Nature Immunology* 17 (8): 906–13.
- Erbay, Ebru, Vladimir R Babaev, Jared R Mayers, Liza Makowski, Khanichi N Charles, Melinda E Snitow, Sergio Fazio, et al. 2009. "Reducing Endoplasmic Reticulum Stress through a Macrophage Lipid Chaperone Alleviates Atherosclerosis." *Nature Medicine* 15 (12): 1383–91.
- Felsenfeld, Gary, and Mark Groudine. 2003. "Controlling the Double Helix." *Nature* 421 (6921): 448–53.
- Fonseca, Elza, Raquel Ruivo, Mónica Lopes-Marques, Huixian Zhang, Miguel M Santos, Byrappa Venkatesh, and L Filipe C Castro. 2017. "LXR α and LXR β Nuclear Receptors Evolved in the Common Ancestor of Gnathostomes." *Genome Biology and Evolution*, January, 305.
- Freigang, Stefan, Franziska Ampenberger, Adrienne Weiss, Thirumala-Devi Kanneganti, Yoichiro Iwakura, Martin Hersberger, and Manfred Kopf. 2013. "Fatty Acid-induced Mitochondrial Uncoupling Elicits Inflammasome-Independent IL-1 α and Sterile Vascular Inflammation in Atherosclerosis." *Nature Immunology* 14 (10). Nature Research: 1045–53.
- Frisch, Steven M., and Joe S. Mymryk. 2002. "Adenovirus-5 E1A: Paradox and Paradigm." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3 (6). Nature Publishing Group: 441–52.
- Ghisletti, Serena, Iros Barozzi, Flore Mietton, Sara Polletti, Francesca De Santa, Elisa Venturini, Lorna Gregory, et al. 2010. "Identification and Characterization of Enhancers Controlling the Inflammatory Gene Expression Program in Macrophages." *Immunity* 32 (3): 317–28.
- Ghisletti, Serena, Wendy Huang, Sumito Ogawa, Gabriel Pascual, Mu-En Lin, Timothy M Willson, Michael G Rosenfeld, and Christopher K. Glass. 2007. "Parallel SUMOylation-Dependent Pathways Mediate Gene- and Signal-Specific Transrepression by LXRs and PPAR γ ." *Molecular Cell* 25 (1): 57–70.
- Gilbert, Luke A, Matthew H Larson, Leonardo Morsut, Zairan Liu, Gloria A Brar, Sandra E Torres, Noam Stern-Ginossar, et al. 2013. "CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes." *Cell* 154 (2): 442–51.
- Ginhoux, F., and S. Jung. 2014. "Monocytes and Macrophages: Developmental Pathways and Tissue Homeostasis." *Nature Reviews Immunology* 14 (6): 392–404.
- Glass, Christopher K., and Sumito Ogawa. 2006. "Combinatorial Roles of Nuclear Receptors in Inflammation and Immunity." *Nature Reviews Immunology* 6 (1). Nature Publishing Group: 44–55.
- Glass, Christopher K., and Kaoru Saijo. 2010. "Nuclear Receptor Transrepression Pathways That Regulate Inflammation in Macrophages and T Cells." *Nature Reviews Immunology* 10 (5): 365–76.
- Greenfield, Edward A. 2014. *Antibodies: A Laboratory Manual, Second Edition*.
- Guan, Hong-Ping, Takahiro Ishizuka, Patricia C Chui, Michael Lehrke, and Mitchell A Lazar. 2005. "Corepressors Selectively Control the Transcriptional Activity of PPAR γ in Adipocytes." *Genes & Development* 19 (4): 453–61.

- Head, Steven R, H Kiyomi Komori, Sarah A LaMere, Thomas Whisenant, Filip Van Nieuwerburgh, Daniel R Salomon, and Phillip Ordoukhanian. 2014. "Library Construction for next-Generation Sequencing: Overviews and Challenges." *BioTechniques* 56 (2): 61–68.
- Heintzman, Nathaniel D, Gary C Hon, R David Hawkins, Pouya Kheradpour, Alexander Stark, Lindsey F Harp, Zhen Ye, et al. 2009. "Histone Modifications at Human Enhancers Reflect Global Cell-Type-Specific Gene Expression." *Nature* 459 (7243): 108–12.
- Heintzman, Nathaniel D, Rhona K Stuart, Gary Hon, Yutao Fu, Christina W Ching, R David Hawkins, Leah O Barrera, et al. 2007. "Distinct and Predictive Chromatin Signatures of Transcriptional Promoters and Enhancers in the Human Genome." *Nature Genetics* 39 (3): 311–18.
- Heinz, Sven, Christopher Benner, Nathanael Spann, Eric Bertolino, Yin C. Lin, Peter Laslo, Jason X. Cheng, Cornelis Murre, Harinder Singh, and Christopher K. Glass. 2010. "Simple Combinations of Lineage-Determining Transcription Factors Prime Cis-Regulatory Elements Required for Macrophage and B Cell Identities." *Molecular Cell* 38 (4): 576–89.
- Hilton, Isaac B, Anthony M D'Ippolito, Christopher M Vockley, Pratiksha I Thakore, Gregory E Crawford, Timothy E Reddy, and Charles A Gersbach. 2015. "Epigenome Editing by a CRISPR-Cas9-Based Acetyltransferase Activates Genes from Promoters and Enhancers." *Nature Biotechnology* 33 (5): 510–17.
- Hocheptied, T, W Van Molle, F G Berger, H Baumann, and C Libert. 2000. "Involvement of the Acute Phase Protein Alpha 1-Acid Glycoprotein in Nonspecific Resistance to a Lethal Gram-Negative Infection." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (20): 14903–9.
- Hong, C., R. Walczak, H. Dhamko, M. N. Bradley, C. Marathe, R. Boyadjian, J. V. Salazar, and P. Tontonoz. 2011. "Constitutive Activation of LXR in Macrophages Regulates Metabolic and Inflammatory Gene Expression: Identification of ARL7 as a Direct Target." *The Journal of Lipid Research* 52 (3): 531–39.
- Hong, Cynthia, and Peter Tontonoz. 2008. "Coordination of Inflammation and Metabolism by PPAR and LXR Nuclear Receptors." *Current Opinion in Genetics & Development* 18 (5): 461–67.
- Horvath, P., and R. Barrangou. 2010. "CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea." *Science* 327 (5962): 167–70.
- Huang, Da Wei, Richard A Lempicki, and Brad T Sherman. 2009. "Systematic and Integrative Analysis of Large Gene Lists Using DAVID Bioinformatics Resources." *Nature Protocols* 4 (1): 44–57.
- Huang, Da Wei, Brad T Sherman, Qina Tan, Jack R Collins, W Gregory Alvord, Jean Roayaei, Robert Stephens, Michael W Baseler, H Clifford Lane, and Richard A Lempicki. 2007. "The DAVID Gene Functional Classification Tool: A Novel Biological Module-Centric Algorithm to Functionally Analyze Large Gene Lists." *Genome Biology* 8 (9). BioMed Central: R183.
- Huang, Johnny X, Mohammad A K Azad, Elizabeth Yuriev, Mark A Baker, Roger L Nation, Jian Li, Matthew A Cooper, and Tony Velkov. 2012. "Molecular Characterization of Lipopolysaccharide Binding to Human α -1-Acid Glycoprotein." *Journal of Lipids* 2012.
- Ishino, Y, H Shinagawa, K Makino, M Amemura, and A Nakata. 1987. "Nucleotide Sequence of the *lap* Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isozyme Conversion in *Escherichia Coli*, and Identification of the Gene Product." *Journal of Bacteriology* 169 (12): 5429–33.

Bibliografía

- Ito, Ayaka, Cynthia Hong, Xin Rong, Xuewei Zhu, Elizabeth J Tarling, Per Niklas Hedde, Enrico Gratton, John Parks, and Peter Tontonoz. 2015. "LXRs Link Metabolism to Inflammation through Abca1-Dependent Regulation of Membrane Composition and TLR Signaling." *eLife* 4 (July): e08009.
- Jakobsson, Tomas, Eckardt Treuter, Jan Åke Gustafsson, and Knut R. Steffensen. 2012. "Liver X Receptor Biology and Pharmacology: New Pathways, Challenges and Opportunities." *Trends in Pharmacological Sciences* 33 (7): 394–404.
- Janeway, Charles A Jr, Paul Travers, Mark Walport, and Mark J Shlomchik. 2001. *Immunobiology*. Garland Science.
- Jansen, R., J. D. A van Embden, W. Gastra, and L. M. Schouls. 2002. "Identification of Genes That Are Associated with DNA Repeats in Prokaryotes." *Molecular Microbiology* 43 (6): 1565–75.
- Jin, Qihuang, Li-Rong Yu, Lifeng Wang, Zhijing Zhang, Lawryn H Kasper, Ji-Eun Lee, Chaochen Wang, Paul K Brindle, Sharon Y R Dent, and Kai Ge. 2011. "Distinct Roles of GCN5/PCAF-Mediated H3K9ac and CBP/p300-Mediated H3K18/27ac in Nuclear Receptor Transactivation." *The EMBO Journal* 30 (2): 249–62.
- Jinek, M., K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, and E. Charpentier. 2012. "A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity." *Science (New York, N.Y.)* 337 (6096): 816–21.
- Joseph, S. B., Michelle N Bradley, Antonio Castrillo, Kevin W Bruhn, Puiying A Mak, Liming Pei, John Hogenesch, et al. 2004. "LXR-Dependent Gene Expression Is Important for Macrophage Survival and the Innate Immune Response." *Cell* 119 (2): 299–309.
- Joseph, S. B., Antonio Castrillo, Bryan A. Laffitte, David J. Mangelsdorf, and Peter Tontonoz. 2003. "Reciprocal Regulation of Inflammation and Lipid Metabolism by Liver X Receptors." *Nature Medicine* 9 (2): 213–19.
- Joseph, S. B., E. McKilligin, L. Pei, M. A. Watson, A. R. Collins, B. A. Laffitte, M. Chen, et al. 2002. "Synthetic LXR Ligand Inhibits the Development of Atherosclerosis in Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (11): 7604–9.
- Kidder, Benjamin L, Gangqing Hu, and Keji Zhao. 2011. "ChIP-Seq: Technical Considerations for Obtaining High-Quality Data." *Nature Immunology* 12 (10): 918–22.
- Kirschning, C J, J Au-Young, N Lamping, D Reuter, D Pfeil, J J Seilhamer, and R R Schumann. 1997. "Similar Organization of the Lipopolysaccharide-Binding Protein (LBP) and Phospholipid Transfer Protein (PLTP) Genes Suggests a Common Gene Family of Lipid-Binding Proteins." *Genomics* 46 (3): 416–25.
- Komor, Alexis C, Ahmed H Badran, and David R Liu. 2017. "CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes." *Cell* 168 (1–2): 20–36.
- Kouzarides, Tony. 2007. "Chromatin Modifications and Their Function." *Cell* 128 (4). Elsevier: 693–705.
- Kurokawa, R, V C Yu, A Näär, S Kyakumoto, Z Han, S Silverman, M G Rosenfeld, and C K Glass. 1993. "Differential Orientations of the DNA-Binding Domain and Carboxy-Terminal Dimerization Interface Regulate Binding Site Selection by Nuclear Receptor Heterodimers." *Genes & Development* 7 (7B): 1423–35.

- Kurt-Jones, E A, D I Beller, S B Mizel, and E R Unanue. 1985. "Identification of a Membrane-Associated Interleukin 1 in Macrophages." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (4): 1204–8.
- Laffitte, Bryan A, Sean B Joseph, Mingyi Chen, Antonio Castrillo, Joyce Repa, Damien Wilpitz, David Mangelsdorf, and Peter Tontonoz. 2003. "The Phospholipid Transfer Protein Gene Is a Liver X Receptor Target Expressed by Macrophages in Atherosclerotic Lesions." *Molecular and Cellular Biology* 23 (6): 2182–91.
- Lee, Stephen D., and Peter Tontonoz. 2015. "Liver X Receptors at the Intersection of Lipid Metabolism and Atherogenesis." *Atherosclerosis* 242 (1): 29–36.
- Liu, X. Shawn, Hao Wu, Xiong Ji, Yonatan Stelzer, Xuebing Wu, Szymon Czauderna, Jian Shu, Daniel Dadon, Richard A. Young, and Rudolf Jaenisch. 2016. "Editing DNA Methylation in the Mammalian Genome." *Cell* 167 (1): 233–247.e17.
- Lopes, R., G. Korkmaz, and R. Agami. 2016. "Applying CRISPR-Cas9 Tools to Identify and Characterize Transcriptional Enhancers." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 17 (9): 597–604.
- Luo, Y, and A R Tall. 2000. "Sterol Upregulation of Human CETP Expression in Vitro and in Transgenic Mice by an LXR Element." *The Journal of Clinical Investigation* 105 (4): 513–20.
- Mak, P. A, B. A Laffitte, C. Desrumaux, S. B Joseph, Li. K Curtiss, D. J Mangelsdorf, Peter Tontonoz, and Peter A Edwards. 2002. "Regulated Expression of the Apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II Gene Cluster in Murine and Human Macrophages. A Critical Role for Nuclear Liver X Receptors Alpha and Beta." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (35): 31900–908.
- Makarova, Kira S., Daniel H. Haft, Rodolphe Barrangou, Stan J. J. Brouns, Emmanuelle Charpentier, Philippe Horvath, Sylvain Moineau, et al. 2011. "Evolution and Classification of the CRISPR–Cas Systems." *Nature Reviews Microbiology* 9 (6). Nature Publishing Group: 467–77.
- Mali, P., K. M. Esvelt, and G. M. Church. 2013. "Cas9 as a Versatile Tool for Engineering Biology." *Nature Methods* 10 (10): 957–63.
- Mangelsdorf, D J, and R M Evans. 1995. "The RXR Heterodimers and Orphan Receptors." *Cell* 83 (6): 841–50.
- Marathe, Chaitra, Michelle N Bradley, Cynthia Hong, Felix Lopez, Carlos M Ruiz de Galarreta, Peter Tontonoz, and Antonio Castrillo. 2006. "The Arginase II Gene Is an Anti-Inflammatory Target of Liver X Receptor in Macrophages." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (43): 32197–206.
- Matthews, Harry R, and Jakob H Waterborg. 1985. "Reversible Modifications of Nuclear Proteins and Their Significance." In *The Enzymology of Post-Translational Modifications of Proteins*, edited by Freedmann R. B. and Hawkins H. C., 125–85. London.
- McCurdy, Teresa R, Amanda L Patrick, Louise J Eltringham-Smith, Varsha Bhakta, William P Sheffield, and Alison E Fox-Robichaud. 2014. "Alpha-1 Acid Glycoprotein Reduces Hepatic Leukocyte Recruitment in Murine Models of Either Early Endotoxemia or Early Sepsis." *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)* 21 (1): 74–83.

Bibliografía

- Medzhitov, R., and Charles A. Jr Janeway. 2002. "Decoding the Patterns of Self and Nonself by the Innate Immune System." *Science* 296 (5566): 298–300.
- Métivier, Raphaël, Graziella Penot, Michael R Hübner, George Reid, Heike Brand, Martin Kos, and Frank Gannon. 2003. "Estrogen Receptor-Alpha Directs Ordered, Cyclical, and Combinatorial Recruitment of Cofactors on a Natural Target Promoter." *Cell* 115 (6): 751–63.
- Mitro, Nico, Puiying A Mak, Leo Vargas, Cristina Godio, Eric Hampton, Valentina Molteni, Andreas Kreuzsch, and Enrique Saez. 2007. "The Nuclear Receptor LXR Is a Glucose Sensor." *Nature* 445 (7124): 219–23.
- Mojica, F. J., C. Díez-Villaseñor, E. Soria, and G. Juez. 2000. "Biological Significance of a Family of Regularly Spaced Repeats in the Genomes of Archaea, Bacteria and Mitochondria." *Molecular Microbiology* 36 (1): 244–46.
- Mojica, F. J., G. Juez, and F. Rodríguez-Valera. 1993. "Transcription at Different Salinities of Haloferax Mediterranei Sequences Adjacent to Partially Modified PstI Sites." *Molecular Microbiology* 9 (3): 613–21.
- Moore, D F, M R Rosenfeld, P M Gribbon, C P Winlove, and C M Tsai. 1997. "Alpha-1-Acid (AAG, Orosomucoid) Glycoprotein: Interaction with Bacterial Lipopolysaccharide and Protection from Sepsis." *Inflammation* 21 (1): 69–82.
- Mori, N, and D Prager. 1996. "Transactivation of the Interleukin-1alpha Promoter by Human T-Cell Leukemia Virus Type I and Type II Tax Proteins." *Blood* 87 (8): 3410–17.
- Morita, Yohei, Akiko Iseki, Satoshi Okamura, Sachie Suzuki, Hiromitsu Nakauchi, and Hideo Ema. 2011. "Functional Characterization of Hematopoietic Stem Cells in the Spleen." *Experimental Hematology* 39 (3): 351–359.e3.
- Nowak, David E., Bing Tian, and Allan R. Brasier. 2005. "Two-Step Cross-Linking Method for Identification of NF-kappaB Gene Network by Chromatin Immunoprecipitation." *BioTechniques* 39 (5): 715–24.
- Olefsky, Jerrold M. 2001. "Nuclear Receptor Minireview Series." *Journal of Biological Chemistry* 276 (40). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 36863–64.
- Ostuni, Renato, Viviana Piccolo, Iros Barozzi, Sara Polletti, Alberto Termanini, Silvia Bonifacio, Alessia Curina, Elena Prosperini, Serena Ghisletti, and Gioacchino Natoli. 2013. "Latent Enhancers Activated by Stimulation in Differentiated Cells." *Cell* 152 (1–2): 157–71.
- Park, Peter J. 2009. "ChIP-Seq: Advantages and Challenges of a Maturing Technology." *Nature Reviews. Genetics* 10 (10): 669–80.
- Pascual, Gabriel, Amy L. Fong, Sumito Ogawa, Amir Gamliel, Andrew C. Li, Valentina Perissi, David W. Rose, Timothy M. Willson, Michael G. Rosenfeld, and Christopher K. Glass. 2005. "A SUMOylation-Dependent Pathway Mediates Transrepression of Inflammatory Response Genes by PPAR-γ." *Nature* 437 (7059). Nature Publishing Group: 759–63.
- Peet, Daniel J., Stephen D. Turley, Wenzhen Ma, Bethany A. Janowski, Jean Marc A Lobaccaro, Robert E. Hammer, and David J. Mangelsdorf. 1998. "Cholesterol and Bile Acid Metabolism Are Impaired in Mice Lacking the Nuclear Oxysterol Receptor LXR Alpha." *Cell* 93 (5): 693–704.

- Pehkonen, Petri, Lynn Welter-Stahl, Janine Diwo, Jussi Ryyänen, Anke Wienecke-Baldacchino, Sami Heikkinen, Eckardt Treuter, Knut R Steffensen, and Carsten Carlberg. 2012. "Genome-Wide Landscape of Liver X Receptor Chromatin Binding and Gene Regulation in Human Macrophages." *BMC Genomics* 13 (1): 50.
- Perissi, Valentina, Aneel Aggarwal, Christopher K Glass, David W Rose, and Michael G Rosenfeld. 2004. "A Corepressor/coactivator Exchange Complex Required for Transcriptional Activation by Nuclear Receptors and Other Regulated Transcription Factors." *Cell* 116 (4): 511–26.
- Perissi, Valentina, Kristen Jepsen, Christopher K Glass, and Michael G Rosenfeld. 2010. "Deconstructing Repression: Evolving Models of Co-Repressor Action." *Nature Reviews. Genetics* 11 (2): 109–23.
- Pfeffer, U, and G Vidali. 1991. "Histone Acetylation: Recent Approaches to a Basic Mechanism of Genome Organization." *The International Journal of Biochemistry* 23 (3): 277–85.
- Plat, Jogchum, Jason A Nichols, and Ronald P Mensink. 2005. "Plant Sterols and Stanols: Effects on Mixed Micellar Composition and LXR (Target Gene) Activation." *Journal of Lipid Research* 46 (11): 2468–76.
- Porez, Geoffrey, Barbara Gross, Janne Prawitt, Céline Gheeraert, Wahiba Berrabah, Jeremy Alexandre, Bart Staels, and Philippe Lefebvre. 2013. "The Hepatic orosomucoid/ α 1-Acid Glycoprotein Gene Cluster Is Regulated by the Nuclear Bile Acid Receptor FXR." *Endocrinology* 154 (10): 3690–3701.
- Qi, Lei S, Matthew H Larson, Luke A Gilbert, Jennifer A Doudna, Jonathan S Weissman, Adam P Arkin, and Wendell A Lim. 2013. "Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression." *Cell* 152 (5): 1173–83.
- Ran, F Ann, Patrick D Hsu, Jason Wright, Vineeta Agarwala, David A Scott, and Feng Zhang. 2013. "Genome Engineering Using the CRISPR-Cas9 System." *Nat Protoc* 8 (11): 2281–2308.
- Rassu, M, S Cazzavillan, M Scagnelli, A Peron, P A Bevilacqua, M Facco, G Bertoloni, F M Lauro, R Zambello, and E Bonoldi. 2001. "Demonstration of Chlamydia Pneumoniae in Atherosclerotic Arteries from Various Vascular Regions." *Atherosclerosis* 158 (1): 73–79.
- Repa, J. J., Knut E Berge, Chris Pomajzl, James A Richardson, Helen Hobbs, and David J Mangelsdorf. 2002. "Regulation of ATP-Binding Cassette Sterol Transporters ABCG5 and ABCG8 by the Liver X Receptors Alpha and Beta." *Journal of Biological Chemistry* 277 (21): 18793–800.
- Repa, J. J., and David J. Mangelsdorf. 2000. "The Role of Orphan Nuclear Receptors in the Regulation of Cholesterol Homeostasis." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16 (1): 459–81.
- Robertson, Gordon, Martin Hirst, Matthew Bainbridge, Misha Bilenky, Yongjun Zhao, Thomas Zeng, Ghia Euskirchen, et al. 2007. "Genome-Wide Profiles of STAT1 DNA Association Using Chromatin Immunoprecipitation and Massively Parallel Sequencing." *Nature Methods* 4 (8): 651–57.
- Rong, Xin, Carolyn J. Albert, Cynthia Hong, Mark A. Duerr, Brian T. Chamberlain, Elizabeth J. Tarling, Ayaka Ito, et al. 2013. "LXRs Regulate ER Stress and Inflammation through Dynamic Modulation of Membrane Phospholipid Composition." *Cell Metabolism* 18 (5): 685–97.
- Rosenfeld, Michael G, Victoria V Lunyak, and Christopher K Glass. 2006. "Sensors and Signals: A Coactivator/corepressor/epigenetic Code for Integrating Signal-Dependent Programs of Transcriptional Response." *Genes & Development* 20 (11): 1405–28.

Bibliografía

- Sallam, T., A. Ito, X. Rong, J. Kim, C. van Stijn, B. T. Chamberlain, M. E. Jung, et al. 2014. "The Macrophage LBP Gene Is an LXR Target That Promotes Macrophage Survival and Atherosclerosis." *The Journal of Lipid Research* 55 (6): 1120–30.
- Schumann, Ralf R. 2011. "Old and New Findings on Lipopolysaccharide-Binding Protein: A Soluble Pattern-Recognition Molecule." *Biochemical Society Transactions* 39 (4): 989–93.
- Schumann, R R, S R Leong, G W Flaggs, P W Gray, S D Wright, J C Mathison, P S Tobias, and R J Ulevitch. 1990. "Structure and Function of Lipopolysaccharide Binding Protein." *Science (New York, N.Y.)* 249 (4975): 1429–31.
- Sharrocks, Andrew D. 2001. "The ETS-Domain Transcription Factor Family." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2 (11): 827–37.
- Sica, Antonio, and Alberto Mantovani. 2012. "Macrophage Plasticity and Polarization: In Vivo Veritas." *The Journal of Clinical Investigation* 122 (3): 787–95.
- Srivastava, Mrinal, Mridula Nambiar, Sheetal Sharma, Subhas S Karki, G Goldsmith, Mahesh Hegde, Sujeet Kumar, et al. 2012. "An Inhibitor of Nonhomologous End-Joining Abrogates Double-Strand Break Repair and Impedes Cancer Progression." *Cell* 151 (7): 1474–87.
- Sterner, D E, and S L Berger. 2000. "Acetylation of Histones and Transcription-Related Factors." *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 64 (2): 435–59.
- Tangirala, Rajendra K, Eric D Bischoff, Sean B Joseph, Brandee L Wagner, Robert Walczak, Bryan A Laffitte, Chris L Daige, et al. 2002. "Identification of Macrophage Liver X Receptors as Inhibitors of Atherosclerosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (18): 11896–901.
- Teboul, M, E Enmark, Q Li, A C Wikström, M Peltö-Huikko, and J A Gustafsson. 1995. "OR-1, a Member of the Nuclear Receptor Superfamily That Interacts with the 9-Cis-Retinoic Acid Receptor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (6): 2096–2100.
- Teupser, D., D. Kretschmar, C. Tennert, R. Burkhardt, W. Wilfert, D. Fengler, R. Naumann, A. E. Sippel, and J. Thiery. 2008. "Effect of Macrophage Overexpression of Murine Liver X Receptor- (LXR-) on Atherosclerosis in LDL-Receptor Deficient Mice." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28 (11): 2009–15.
- Thomas, Graham D, Richard N Hanna, Neelakatan T Vasudevan, Anouk A Hamers, Casey E Romanoski, Sara McArdle, Kevin D Ross, et al. 2016. "Deleting an Nr4a1 Super-Enhancer Subdomain Ablates Ly6C(low) Monocytes While Preserving Macrophage Gene Function." *Immunity* 45 (5): 975–87.
- Tilg, H, E Vannier, G Vachino, C A Dinarello, and J W Mier. 1993. "Antiinflammatory Properties of Hepatic Acute Phase Proteins: Preferential Induction of Interleukin 1 (IL-1) Receptor Antagonist over IL-1 Beta Synthesis by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 178 (5): 1629–36.
- Tobias, P S, K Soldau, and R J Ulevitch. 1986. "Isolation of a Lipopolysaccharide-Binding Acute Phase Reactant from Rabbit Serum." *The Journal of Experimental Medicine* 164 (3): 777–93.

- Torra, Inés Pineda, Naima Ismaili, Jonathan E Feig, Chong-Feng Xu, Claudio Cavasotto, Raluca Pancratov, Inez Rogatsky, Thomas A Neubert, Edward A Fisher, and Michael J Garabedian. 2008. "Phosphorylation of Liver X Receptor Alpha Selectively Regulates Target Gene Expression in Macrophages." *Molecular and Cellular Biology* 28 (8): 2626–36.
- Valledor, Annabel F, Li-Chung Hsu, Sumito Ogawa, Dominique Sawka-Verhelle, Michael Karin, and Christopher K Glass. 2004. "Activation of Liver X Receptors and Retinoid X Receptors Prevents Bacterial-Induced Macrophage Apoptosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (51): 17813–18.
- Venkateswaran, A., B. A. Laffitte, S. B. Joseph, P. A. Mak, D. C. Wilpitz, P. A. Edwards, and P. Tontonoz. 2000a. "Control of Cellular Cholesterol Efflux by the Nuclear Oxysterol Receptor LXRA." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (22): 12097–102.
- Venkateswaran, A, J J Repa, J M Lobaccaro, A Bronson, D J Mangelsdorf, and P A Edwards. 2000b. "Human White/murine ABC8 mRNA Levels Are Highly Induced in Lipid-Loaded Macrophages. A Transcriptional Role for Specific Oxysterols." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (19): 14700–707.
- Vreugdenhil, A C, A M Snoek, C van 't Veer, J W Greve, and W A Buurman. 2001. "LPS-Binding Protein Circulates in Association with apoB-Containing Lipoproteins and Enhances Endotoxin-LDL/VLDL Interaction." *The Journal of Clinical Investigation* 107 (2): 225–34.
- Walczak, Robert, Sean B Joseph, Bryan A Laffitte, Antonio Castrillo, Liming Pei, and Peter Tontonoz. 2004. "Transcription of the Vascular Endothelial Growth Factor Gene in Macrophages Is Regulated by Liver X Receptors." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (11): 9905–11.
- Wang, Zhibin, Chongzhi Zang, Jeffrey A Rosenfeld, Dustin E Schones, Artem Barski, Suresh Cuddapah, Kairong Cui, et al. 2008. "Combinatorial Patterns of Histone Acetylations and Methylations in the Human Genome." *Nature Genetics* 40 (7): 897–903.
- Williams, J P, M R Weiser, T T Pechet, L Kobzik, F D Moore, and H B Hechtman. 1997. "Alpha 1-Acid Glycoprotein Reduces Local and Remote Injuries after Intestinal Ischemia in the Rat." *The American Journal of Physiology* 273 (5 Pt 1): G1031-5.
- Willy, P J, K Umesono, E S Ong, R M Evans, R A Heyman, and D J Mangelsdorf. 1995. "LXR, a Nuclear Receptor That Defines a Distinct Retinoid Response Pathway." *Genes & Development* 9 (9): 1033–45.
- Wynn, Thomas A., Ajay Chawla, and Jeffrey W. Pollard. 2013. "Macrophage Biology in Development, Homeostasis and Disease." *Nature* 496 (7446): 445–55.
- Zelcer, Noam, Cynthia Hong, Rima Boyadjian, and Peter Tontonoz. 2009. "LXR Regulates Cholesterol Uptake through Idol-Dependent Ubiquitination of the LDL Receptor." *Science (New York, N.Y.)* 325 (5936): 100–104.
- Zeng, Ping Yao, Christopher R. Vakoc, Zhu Chu Chen, Gerd A. Blobel, and Shelley L. Berger. 2006. "In Vivo Dual Cross-Linking for Identification of Indirect DNA-Associated Proteins by Chromatin Immunoprecipitation." *BioTechniques* 41 (6): 694–98.

Bibliografía

- Zhai, Yonggong, Tara Wada, Bin Zhang, Shaheen Khadem, Songrong Ren, Ramalinga Kuruba, Song Li, and Wen Xie. 2010. "A Functional Cross-Talk between Liver X Receptor- α and Constitutive Androstane Receptor Links Lipogenesis and Xenobiotic Responses." *Molecular Pharmacology* 78 (4): 666–74.
- Zhang, Yuan, Sarah R Breevoort, Jerry Angdisen, Mingui Fu, Daniel R Schmidt, Sam R Holmstrom, Steven A Kliewer, David J Mangelsdorf, and Ira G Schulman. 2012. "Liver LXR α Expression Is Crucial for Whole Body Cholesterol Homeostasis and Reverse Cholesterol Transport in Mice." *The Journal of Clinical Investigation* 122 (5): 1688–99.
- Zuercher, William J., Richard G. Buckholz, Nino Campobasso, Jon L. Collins, Cristin M. Galardi, Robert T. Gampe, Stephen M. Hyatt, et al. 2010. "Discovery of Tertiary Sulfonamides as Potent Liver X Receptor Antagonists." *Journal of Medicinal Chemistry* 53 (8): 3412–16.
- Zweigner, Janine, Hans-Joachim Gramm, Oliver C. Singer, Karl Wegscheider, and Ralf R. Schumann. 2001. "High Concentrations of Lipopolysaccharide-Binding Protein in Serum of Patients with Severe Sepsis or Septic Shock Inhibit the Lipopolysaccharide Response in Human Monocytes." *Blood* 98 (13).

